

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
11. Januar 2001 (11.01.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 01/02591 A1

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/82,  
9/02, 15/53, C12P 7/64, C11C 3/00, A01H 5/00, 13/00,  
15/00, A23L 1/30, A23K 1/16, A61K 35/78

(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGE-  
SELLSCHAFT; 67056 Ludwigshafen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/06223

(22) Internationales Anmeldedatum:  
4. Juli 2000 (04.07.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
09/347,531 6. Juli 1999 (06.07.1999) US  
100 30 976.3 30. Juni 2000 (30.06.2000) DE

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,  
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,  
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-  
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,  
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,  
SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US*): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE];  
D-67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): HEINZ, Ernst  
[DE/DE]; Puettkampsweg 13, D-22609 Hamburg (DE).  
GIRKE, Thomas [DE/US]; 16945 Vinaruz Place, San  
Diego, CA 92128 (US). SCHEFFLER, Jodi [US/US]; 51  
Country Road 228, Oxford, MS 38655 (US). DA COSTA  
E SILVA, Oswaldo [BR/US]; 203 Littleford Lane, Apex,  
NC 27502 (US).

**Veröffentlicht:**

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden  
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen  
eintreffen.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: PLANTS EXPRESSING  $\Delta$ 6-DESATURASE GENES AND OILS FROM THESE PLANTS CONTAINING PUFAS  
AND METHOD FOR PRODUCING UNSATURATED FATTY ACIDS

(54) Bezeichnung:  $\Delta$ 6-DESATURASEGENE EXPRIMIERENDE PFLANZEN UND PUFAS ENTHALTENDE ÖLE AUS DIE-  
SEN PFLANZEN UND EIN VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG UNGESÄTTIGTER FETTSÄUREN

(57) Abstract: The invention relates to an improved method for producing unsaturated fatty acids and to a method for producing  
triglycerides with an increased unsaturated fatty acid content. The invention also relates to the production of a transgenic organism,  
preferably a transgenic plant or a transgenic micro-organism, containing increased quantities of unsaturated fatty acids, oils or lipids  
with  $\Delta$ 6-double bonds as a result of the expression of a  $\Delta$ 6-desaturase, from moss. The invention also relates to transgenic organ-  
isms containing a  $\Delta$ 6-desaturase gene, and to the use of the unsaturated fatty acids or triglycerides with an increased unsaturated  
fatty acid content produced in the method.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein verbessertes Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Fettsäu-  
ren sowie ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren. Die Erfindung  
betrifft die Herstellung eines transgenen Organismus bevorzugt einer transgenen Pflanze oder eines transgenen Mikroorganismus  
mit erhöhtem Gehalt an Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit  $\Delta$ 6-Doppelbindungen aufgrund der Expression einer  $\Delta$ 6-Desaturase aus  
Moos. Ausserdem betrifft die Erfindung transgene Organismen, die ein  $\Delta$ 6-Desaturasegen enthalten, sowie die Verwendung der im  
Verfahren hergestellten ungesättigten Fettsäuren bzw. Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren.

WO 01/02591 A1

$\Delta$ 6-Desaturasegene exprimierende Pflanzen und PUFAS enthaltende Öle aus diesen Pflanzen und ein Verfahren zur Herstellung ungesättigter Fettsäuren

5

#### Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein verbessertes Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren sowie ein Verfahren  
10 zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren. Die Erfindung betrifft die Herstellung eines transgenen Organismus bevorzugt einer transgenen Pflanze oder eines transgenen Mikroorganismus mit erhöhtem Gehalt an Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit  $\Delta$ 6-Doppelbindungen aufgrund  
15 der Expression einer  $\Delta$ -6-Desaturase aus Moos.

Außerdem betrifft die Erfindung transgene Organismen, die ein  $\Delta$ 6-Desaturasegen enthalten, sowie die Verwendung der im Verfahren hergestellten ungesättigten Fettsäuren bzw. Triglyceride mit  
20 einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren.

Fettsäuren und Triglyceride haben eine Vielzahl von Anwendungen in der Lebensmittelindustrie, der Tierernährung, der Kosmetik und im Pharmabereich. Je nachdem ob es sich um freie gesättigte oder  
25 ungesättigte Fettsäuren oder um Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren handelt, sind sie für die unterschiedlichsten Anwendungen geeignet, so werden beispielsweise mehrfach ungesättigte Fettsäuren Babynahrung zur Erhöhung des Nährwertes zugesetzt. Hauptsächlich werden die ver-  
30 schiedenen Fettsäuren und Triglyceride aus Mikroorganismen wie Mortierella oder aus Öl-produzierenden Pflanzen wie Soja, Raps, Sonnenblume und weiteren gewonnen, wobei sie in der Regel in Form ihrer Triacylglyceride anfallen. Sie können aber auch aus Tieren wie Fischen gewonnen werden. Die freien Fettsäuren werden vor-  
35 teilhaft durch Verseifung hergestellt.

Je nach Anwendungszweck sind Öle mit gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren bevorzugt, so sind z.B. in der humanen Ernährung Lipide mit ungesättigten Fettsäuren speziell mehrfach ungesättig-  
40 ten Fettsäuren bevorzugt, da sie einen positiven Einfluß auf den Cholesterinspiegel im Blut und damit auf die Möglichkeit einer Herzerkrankung haben. Auch eine positive Wirkung auf die Carcinogenese wird den ungesättigten Fettsäuren zugeschrieben. Sie sind außerdem wichtige Ausgangsstoffe für die Synthese von  
45 Verbindungen, die wichtige biologische Vorgänge innerhalb des

Organismus steuern. Sie finden deshalb in verschiedenen diätischen Lebensmitteln oder Medikamenten Anwendung.

Aufgrund ihrer positiven Eigenschaften hat es in der Vergangenheit nicht an Ansätzen gefehlt, Gene, die an der Synthese von Fettsäuren bzw. Triglyceriden beteiligt sind, für die Herstellung von Ölen in verschiedenen Organismen mit geändertem Gehalt an ungesättigten Fettsäuren verfügbar zu machen. So wird in WO 91/13972 und seinem US-Äquivalent eine  $\Delta 9$ -Desaturase beschrieben. In WO 93/11245 wird eine  $\Delta 15$ -Desaturase in WO 94/11516 wird eine  $\Delta 12$ -Desaturase beansprucht.  $\Delta 6$ -Desaturasen werden in Girke et al. (The Plant Journal, 15, 1998: 39-48), Napier et al. (Biochem. J., 330, 1998: 611-614), Murata et al. (Biosynthesis of  $\gamma$ -linolenic acid in cyanobacterium *Spirulina patensis*, pp 22-32, In:  $\gamma$ -linolenic acid, metabolism and its roles in nutrition and medicine, Huang, Y. and Milles, D.E. [eds.], AOC Press, Champaign, Illinois), Sayanova et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 1997: 4211-4216), WO 98/46764, Cho et al. (J. Biol. Chem., 274, 1999: 471-477), Aki et al. (Biochem. Biophys. Res. Commun., 255, 1999: 575-579), und Reddy et al. (Plant Mol. Biol., 27, 1993: 293-300) beschrieben. Weitere Desaturasen werden beispielsweise in EP-A-0 550 162, WO 94/18337, WO 97/30582, WO 97/21340, WO 95/18222, EP-A-0 794 250, Stukey et al., J. Biol. Chem., 265, 1990: 20144-20149, Wada et al., Nature 347, 1990: 200-203 oder Huang et al., Lipids 34, 1999: 649-659 beschrieben. Weitere  $\Delta 6$ -Desaturasen werden in WO 93/06712, US 5,614,393, US5,614,393, WO 96/21022, WO00/21557 und WO 99/27111 beschrieben. Die biochemische Charakterisierung der verschiedenen Desaturasen ist jedoch bisher nur unzureichend erfolgt, da die Enzyme als membrangebundene Proteine nur sehr schwer zu isolieren und charakterisieren sind (McKeon et al., Methods in Enzymol. 71, 1981: 12141-12147, Wang et al., Plant Physiol. Biochem., 26, 1988: 777-792). In der Regel erfolgt die Charakterisierung membrangebundener Desaturasen durch Einbringung in einen geeigneten Organismus, der anschließend auf Enzymaktivität mittels Edukt- und Produktanalyse untersucht wird. Die Anwendung zur Produktion in transgenen Organismen beschrieben wie in WO 98/46763 WO98/46764, WO98/46765. Dabei wird auch die Expression verschiedener Desaturasen wie in WO99/64616 oder WO98/46776 und Bildung polyungesättigter Fettsäuren beschrieben und beansprucht. Bezüglich der Effektivität der Expression von Desaturasen und ihren Einfluß auf die Bildung polyungesättigter Fettsäuren ist anzumerken, daß durch Expression einer einzelnen Desaturase wie im vorgenannten Stand der Technik beschrieben lediglich geringe Gehalte an ungesättigten Fettsäuren beispielsweise an  $\Delta$ -6 ungesättigten Fettsäuren/Lipiden wie z.B.  $\gamma$ -Linolensäure erreicht wurden und werden.

## 3

Nach wie vor besteht daher ein großer Bedarf an neuen und besser geeigneten Genen, die für Enzyme codieren, die an der Biosynthese ungesättigter Fettsäuren beteiligt sind und es ermöglichen, diese in einem technischen Maßstab herzustellen. Weiterhin besteht  
5 nach wie vor ein Bedarf an verbesserten Verfahren zur Gewinnung möglichst hoher Gehalte an polyungesättigten Fettsäuren.

Es bestand daher die Aufgabe ein Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren unter Verwendung von Genen, die  
10 beispielsweise für Desaturase-Enzyme codieren und die an der Synthese mehrfach ungesättigter Fettsäuren in den Samen einer Ölseed beteiligt sind, bereitzustellen und so den Gehalt polyungesättigter Fettsäuren zu erhöhen. Diese Aufgabe wurde durch ein Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren  
15 gelöst, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine isolierte Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid mit  $\Delta 6$ -Desaturaseaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz,  
20
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1 ableiten
- 25 c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 50 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert  
30 ist,

in einen Organismus eingebracht wird, dieser Organismus angezogen wird, wobei der angezogene Organismus mindestens 1 Mol-% ungesättigte Fettsäuren bezogen auf den gesamten Fettsäuregehalt  
35 im Organismus enthält.

Unter Anzucht des Organismus ist die Kultivierung von Pflanzen ebenso zu verstehen wie die Anzucht von eukaryontischen oder prokaryontischen Mikroorganismen wie Bakterien, Hefen, Pilzen,  
40 Ciliaten, Algen, Cyanobakterien, tierischen oder pflanzlichen Zellen oder Zellverbänden oder die Anzucht von Tieren.

Die in den im erfindungsgemäßen Verfahren gewonnenen Organismen enthalten in der Regel ungesättigte Fettsäuren in Form von  
45 gebundenen Fettsäuren, das heißt die ungesättigten Fettsäuren liegen überwiegend in Form ihrer Mono-, Di- oder Triglyceride, Glycolipide, Lipoproteine oder Phospholipide wie Öle oder Lipide

oder sonstig als Ester oder Amide gebundenen Fettsäuren vor. Auch freie Fettsäuren sind in den Organismen in Form der freien Fettsäuren oder in Form ihrer Salze enthalten. Die freien oder gebundenen ungesättigten Fettsäuren enthalten vorteilhaft gegen-  
5 über den Ausgangsorganismen einen erhöhten Gehalt an Fettsäuren mit  $\Delta 6$ -Doppelbindungen wie vorteilhaft  $\gamma$ -Linolensäure. Die durch Anzucht im erfindungsgemäßen Verfahren gewonnenen Organismen und die in ihnen enthaltenen ungesättigten Fettsäuren können direkt beispielsweise zur Herstellung von pharmazeutischen  
10 Zubereitungen, von Agrochemikalien, Futtermitteln oder Lebensmitteln verwendet werden oder aber nach Isolierung aus den Organismen. Dabei können alle Stufen der Aufreinigung der ungesättigten Fettsäuren verwendet werden, das heißt von Rohextrakten der Fettsäuren bis zu vollständig gereinigten Fettsäuren sind für  
15 die Herstellung der vorgenannten Produkte geeignet. In einer vorteilhaften Ausführungsform können die gebundenen Fettsäuren aus beispielsweise den Ölen bzw. Lipiden beispielsweise über eine basische Hydrolyse z.B. mit NaOH oder KOH freigesetzt werden. Diese freien Fettsäuren können direkt im erhaltenen Gemisch oder  
20 nach weiterer Aufreinigung zur Herstellung von pharmazeutischen Zubereitungen, von Agrochemikalien, Futtermitteln oder Lebensmitteln verwendet werden. Auch können die gebundenen oder freien Fettsäuren zur Umesterung oder Veresterung beispielsweise mit anderen Mono-, Di- oder Triglyceriden oder Glycerin verwendet  
25 werden, um den Anteil an ungesättigten Fettsäuren in diesen Verbindungen beispielsweise in den Triglyceriden zu erhöhen.

Ein weiterer erfindungsgemäßer Gegenstand ist ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, indem man Triglyceride mit gesättigten oder  
30 ungesättigten oder gesättigten und ungesättigten Fettsäuren mit mindestens einem der Protein, das durch die Sequenz SEQ ID NO: 2 codiert wird, inkubiert. Vorteilhaft wird das Verfahren in Gegenwart von Verbindungen durchgeführt, die Reduktionsäquivalente  
35 aufnehmen oder abgeben können. Anschließend können die Fettsäuren aus den Triglyceriden freigesetzt werden.

Die oben genannten Verfahren ermöglichen vorteilhaft die Synthese von Fettsäuren oder gebundenen Fettsäuren wie Triglyceriden mit  
40 einem erhöhten Gehalt an Fettsäuren mit  $\Delta 6$ -Doppelbindungen.

Als Organismen für die genannten Verfahren seien beispielhaft Pflanzen wie Arabidopsis, Gerste, Weizen, Roggen, Hafer, Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Tee, Karotte, Paprika, Canola,  
45 Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Triticale, Tabak, Tomate, Raps, Kaffee, Tapioka, Maniok, Pfeilwurz, Tagetes, Alfalfa, Erdnuß, Rizinus, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor (Carthamus

- tinctorius), Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, oder Kakaobohne, Mikroorganismen wie Pilze *Mortierella*, *Saprolegnia* oder *Pythium*, Bakterien wie die Gattung *Escherichia*, Cyanobakterien, Algen oder Protozoen wie Dinoflagellaten wie
- 5 *Cryptocodinium* genannt. Bevorzugt werden Organismen, die natürlicherweise Öle in größeren Mengen synthetisieren können wie Mikroorganismen wie Pilze wie *Mortierella alpina*, *Pythium insidiosum* oder Pflanzen wie Soja, Raps, Kokosnuß, Ölpalme, Canola, Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*), Rizinus, Calendula,
- 10 Lein, Borretsch, Erdnuß, Kakaobohne oder Sonnenblume, besonders bevorzugt werden Soja, Raps oder Sonnenblume.

- Die in den Verfahren verwendeten Organismen werden je nach Wirtsorganismus in dem Fachmann bekannter Weise angezogen bzw.
- 15 gezüchtet. Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze, Ciliaten, pflanzliche oder tierische Zellen werden in der Regel in einem flüssigen Medium, das eine Kohlenstoffquelle meist in Form von Zuckern, eine Stickstoffquelle meist in Form von organischen Stickstoffquellen wie Hefeextrakt oder Salzen wie Ammoniumsulfat,
- 20 Spurenelemente wie Eisen-, Mangan-, Magnesiumsalze und gegebenenfalls Vitamine enthält, bei Temperaturen zwischen 0°C und 100°C, bevorzugt zwischen 10°C bis 60°C unter je nach Organismus Sauerstoffbegasung oder in Abwesenheit von Sauerstoff angezogen. Dabei kann der pH der Nährflüssigkeit auf einen festen Wert gehalten
- 25 werden, das heißt der pH wird während der Anzucht reguliert oder der pH wird nicht reguliert und verändert sich während der Anzucht. Die Anzucht kann batch weise, semi batch weise oder kontinuierlich erfolgen. Nährstoffe können zu Beginn der Fermentation vorgelegt oder semikontinuierlich oder kontinuier-
- 30 lich nach gefüttert werden. Auch eine Anzucht auf festen Medien ist möglich.

- Pflanzen werden nach Transformation in der Regel zunächst regeneriert und anschließend wie üblich angezogen bzw. angebaut.
- 35 Dies kann im Gewächshaus oder im Freiland erfolgen.

- Aus den Organismen werden nach Anzucht die Lipide in üblicher Weise gewonnen. Hierzu können die Organismen nach Ernte zunächst aufgeschlossen werden oder direkt verwendet werden. Die Lipide
- 40 werden vorteilhaft mit geeigneten Lösungsmitteln wie apolare Lösungsmittel wie Hexan oder Ethanol, Isopropanol oder Gemischen wie Hexan/Isopropanol, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol bei Temperaturen zwischen 0°C bis 80°C, bevorzugt zwischen 20°C bis 50°C extrahiert. Die Biomasse wird in der Regel mit einem Über-
- 45 schuß an Lösungsmittel extrahiert beispielsweise einem Überschuß von Lösungsmittel zu Biomasse von 1:4. Das Lösungsmittel wird anschließend beispielsweise über eine Destillation entfernt.

## 6

Die Extraktion kann auch mit superkritischem CO<sub>2</sub> erfolgen. Nach Extraktion kann die restliche Biomasse beispielsweise über Filtration entfernt werden.

- 5 Das so gewonnene Rohöl kann anschließend weiter aufgereinigt werden, beispielsweise in dem Trübungen über das Versetzen mit polaren Lösungsmittel wie Aceton oder Chloroform und anschließender Filtration oder Zentrifugation entfernt werden. Auch eine weitere Reinigung über chromatographische Verfahren, 10 Destillation oder Kristallisation ist möglich.

Zur Gewinnung der freien Fettsäuren aus den Triglyceriden werden diese in üblicher Weise, wie oben beschrieben, verseift.

- 15 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind ungesättigte Fettsäuren sowie Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, die nach den oben genannten Verfahren hergestellt wurden, sowie deren Verwendung zur Herstellung von Nahrungsmitteln, Tierfutter, Kosmetika oder Pharmazeutika. Hierzu 20 werden diese den Nahrungsmitteln, dem Tierfutter, den Kosmetika oder Pharmazeutika in üblichen Mengen zugesetzt.

- Im erfindungsgemäßen Verfahren wurden durch Expression einer  $\Delta 6$ -Desaturase aus Moos in Organismen wie Pilze, Bakterien, 25 Tieren oder Pflanzen, bevorzugt Pilzen, Bakterien und Pflanzen, besonders bevorzugt in Pflanzen, ganz besonders bevorzugt in Ölfruchtpflanzen wie Raps, Canola, Lein, Soja, Sonnenblume, Borretsch, Rizinus, Ölpalme, Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*), Kokosnuß, Erdnuß oder Kakaobohne höhere Gehalte an ungesättigten 30 Fettsäuren wie  $\gamma$ -Linolensäure erhalten. Auch die Expression in Feldfrüchten, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Alfalfa, oder Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee) ist vorteilhaft. Durch die Expression eines Gens, das für eine  $\Delta 6$ -Desaturase aus Moos codiert, in den oben genannten Organismen 35 können Gehalte an ungesättigten Fettsäuren in den Organismen von mindestens 1 Mol-%, bevorzugt mindestens 3 Mol-%, besonders bevorzugt mindestens 4 Mol-%, ganz besonders bevorzugt mindestens 5 Mol-% erreicht werden.

- 40 Unter Derivate(n) sind beispielsweise funktionelle Homologe der von SEQ ID NO: 1 codierten Enzyme oder deren enzymatischer Aktivität, das heißt Enzyme, die dieselben enzymatischen Reaktionen wie die von SEQ ID NO: 1 katalysieren, zu verstehen. Diese Gene ermöglichen ebenfalls eine vorteilhafte Herstellung 45 von ungesättigten Fettsäuren mit Doppelbindungen in  $\Delta 6$ -Position. Unter ungesättigten Fettsäuren sind im folgenden doppelt oder mehrfach ungesättigte Fettsäuren, die Doppelbindungen aufweisen,

zu verstehen. Die Doppelbindungen können konjugiert oder nicht konjugiert sein. Die in SEQ ID NO: 1 genannte Sequenz codiert für ein Enzym, das eine  $\Delta 6$ -Desaturase-Aktivität aufweist.

- 5 Das erfindungsgemäße Enzym  $\Delta 6$ -Desaturase führt vorteilhaft in Fettsäurereste von Glycerolipiden eine *cis*-Doppelbindung in Position C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub> ein (siehe SEQ ID NO: 1). Das Enzym hat außerdem eine  $\Delta 6$ -Desaturase-Aktivität, die vorteilhaft in Fettsäurereste von Glycerolipiden ausschließlich eine *cis*-Doppelbindung in
- 10 Position C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub> einführt. Diese Aktivität hat auch das Enzym mit der in SEQ ID NO: 1 genannten Sequenz, bei dem es sich um eine monofunktionelle  $\Delta 6$ -Desaturase handelt.

- Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäure-
- 15 sequenz(en) (für die Anmeldung soll der singular den plural umfassen und umgekehrt) oder Fragmente davon können vorteilhaft zur Isolierung weiterer genomischer Sequenzen über Homologie-screening verwendet werden.

- 20 Die genannten Derivate lassen sich beispielsweise aus anderen Organismen eukaryontischen Organismen wie Pflanzen wie speziell Moosen, Dinoflagellaten oder Pilze isolieren.

- Weiterhin sind unter Derivaten bzw. funktionellen Derivaten der
- 25 in SEQ ID NO: 1 genannten Sequenz beispielsweise Allelvarianten zu verstehen, die mindestens 50 % Homologie auf der abgeleiteten Aminosäureebene, vorteilhaft mindestens 70 % Homologie, bevorzugt mindestens 80 % Homologie, besonders bevorzugt mindestens 85 % Homologie, ganz besonders bevorzugt 90 % Homologie aufweisen.
- 30 Die Homologie wurde über den gesamten Aminosäurebereich berechnet. Es wurde das Programm PileUp, BESTFIT, GAP, TRANSLATE bzw. BACKTRANSLATE (= Bestandteil des Programmpaketes UWGCG, Wisconsin Package, Version 10.0-UNIX, January 1999, Genetics Computer Group, Inc., Deverux et al., Nucleic Acid Res., 12,
- 35 1984: 387-395) verwendet (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151-153). Die von den genannten Nukleinsäuren abgeleitete Aminosäuresequenz ist Sequenz SEQ ID NO: 2 zu entnehmen. Unter Homologie ist Identität zu verstehen, das heißt die Aminosäuresequenzen sind zu mindestens
- 40 50 % identisch. Die erfindungsgemäßen Sequenzen sind auf Nukleinsäureebene mindestens 65 % homolog, bevorzugt mindestens 70 %, besonders bevorzugt 75 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 80 %.

- 45 Allelvarianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz erhältlich sind, wobei



die enzymatische Aktivität der abgeleiteten synthetisierten Proteine erhalten bleibt.

- Solche DNA-Sequenzen lassen sich ausgehend von der in
- 5 SEQ ID NO: 1 beschriebenen DNA-Sequenz oder Teilen dieser Sequenzen, beispielsweise mit üblichen Hybridisierungsverfahren oder der PCR-Technik aus anderen Eukaryonten wie beispielsweise den oben genannt isolieren. Diese DNA-Sequenzen hybridisieren unter Standardbedingungen mit den genannten Sequenzen. Zur
- 10 Hybridisierung werden vorteilhaft kurze Oligonukleotide beispielsweise der konservierten Bereiche, die über Vergleiche mit anderen Desaturasegenen in dem Fachmann bekannter Weise ermittelt werden können, verwendet. Vorteilhaft werden die Histidin-Box-Sequenzen verwendet. Es können aber auch längere Fragmente der
- 15 erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder die vollständigen Sequenzen für die Hybridisierung verwendet werden. Je nach der verwendeten Nukleinsäure: Oligonukleotid, längeres Fragment oder vollständige Sequenz oder je nachdem welche Nukleinsäureart DNA oder RNA für die Hybridisierung verwendet werden, variieren diese Standard-
- 20 bedingungen. So liegen beispielsweise die Schmelztemperaturen für DNA:DNA-Hybride ca. 10°C niedriger als die von DNA:RNA-Hybriden gleicher Länge.

- Unter Standardbedingungen sind beispielsweise je nach Nukleinsäure Temperaturen zwischen 42 und 58°C in einer wäßrigen Pufferlösung mit einer Konzentration zwischen 0,1 bis 5 x SSC (1 X SSC = 0,15 M NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,2) oder zusätzlich in Gegenwart von 50 % Formamid wie beispielsweise 42°C in 5 x SSC, 50 % Formamid zu verstehen. Vorteilhafterweise liegen die
- 30 Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 20°C bis 45°C, bevorzugt zwischen etwa 30°C bis 45°C. Für DNA:RNA-Hybride liegen die Hybridisierungsbedingungen vorteilhaft bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 30°C bis 55°C, bevorzugt zwischen etwa 45°C bis 55°C. Diese
- 35 angegebenen Temperaturen für die Hybridisierung sind beispielhaft kalkulierte Schmelztemperaturwerte für eine Nukleinsäure mit einer Länge von ca. 100 Nukleotiden und einem G + C-Gehalt von 50 % in Abwesenheit von Formamid. Die experimentellen Bedingungen für die DNA-Hybridisierung sind in einschlägigen Lehrbüchern der
- 40 Genetik wie beispielsweise Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, beschrieben und lassen sich nach dem Fachmann bekannten Formeln beispielsweise abhängig von der Länge der Nukleinsäuren, der Art der Hybride oder dem G + C-Gehalt berechnen. Weitere Informationen zur Hybridisierung kann
- 45 der Fachmann folgenden Lehrbüchern entnehmen: Ausubel et al. (eds), 1985, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York; Hames and Higgins (eds), 1985, Nucleic Acids

Hybridization: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, Essential Molecular Biology: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

5

Weiterhin sind unter Derivaten Homologe der Sequenz SEQ ID No: 1 beispielsweise eukaryontische Homologe, verkürzte Sequenzen, Einzelstrang-DNA der codierenden und nichtcodierenden DNA-Sequenz oder RNA der codierenden und nichtcodierenden DNA-Sequenz zu

10 verstehen.

Außerdem sind unter Homologen der Sequenz SEQ ID NO: 1 Derivate wie beispielsweise Promotorvarianten zu verstehen. Diese Varianten können durch ein oder mehrere Nukleotidaustausche, durch

15 Insertion(en) und/oder Deletion(en) verändert sein, ohne daß aber die Funktionalität bzw. Wirksamkeit der Promotoren beeinträchtigt sind. Des weiteren können die Promotoren durch Veränderung ihrer Sequenz in ihrer Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirksamere Promotoren auch artfremder Organismen ausgetauscht werden.

20

Unter Derivaten sind auch vorteilhaft Varianten zu verstehen, deren Nukleotidsequenz im Bereich -1 bis -2000 vor dem Startcodon so verändert wurden, daß die Genexpression und/oder die Proteinexpression verändert, bevorzugt erhöht wird. Weiterhin sind unter

25 Derivaten auch Varianten zu verstehen, die am 3'-Ende verändert wurden.

Die Nukleinsäuresequenzen, die für eine  $\Delta 6$ -Desaturase codiert, können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder

30 eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen  $\Delta 6$ -Desaturase-Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen. Im allgemeinen werden synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Codons erzeugt, die von den entsprechenden Wirtsorganismen beispielsweise Pflanzen35 bevorzugt werden. Dies führt in der Regel zu einer optimalen Expression der heterologen Gene. Diese von Pflanzen bevorzugten Codons können aus Codons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden. Ein Beispiel für *Corynebacterium*40 glutamicum ist gegeben in: Wada et al. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:2111-2118). Die Durchführung solcher Experimente sind mit Hilfe von Standardmethoden durchführbar und sind dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt.45 Funktionell äquivalente Sequenzen, die für das  $\Delta 6$ -Desaturase-Gen codieren, sind solche Derivate der erfindungsgemäßen Sequenz, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz noch die gewünschten

Funktionen, das heißt die enzymatische Aktivität der Proteine besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den  
5 Codon-Gebrauch einer Pflanze angepaßte, künstliche Nukleotid-Sequenzen.

Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschte Eigenschaft beispiels-  
10 weise der Erhöhung des Gehaltes von  $\Delta 6$ -Doppelbindungen in Fettsäuren, Ölen oder Lipiden in der Pflanze durch Überexpression des  $\Delta 6$ -Desaturase-Gens in Kulturpflanzen vermitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung mittels Molecular Modelling konstruierter Proteine,  
15 die  $\Delta 6$ -Desaturase-Aktivität aufweisen oder durch in vitro-Selektion ermittelt werden. Mögliche Techniken zur in vitro-Evolution von DNA zur Veränderung bzw. Verbesserung der DNA-Sequenzen sind beschrieben bei Patten, P.A. et al., Current Opinion in Biotechnology 8, 724-733 (1997) oder bei Moore, J.C.  
20 et al., Journal of Molecular Biology 272, 336-347 (1997). Besonders geeignet sind codierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen odon-Nutzung erhalten werden. Die spezifische Codon-Nutzung kann ein mit pflanzen genetischen  
25 Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.

Als weitere geeignete äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind zu nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine codieren, wobei  
30 Bestandteil des Fusionsproteins ein  $\Delta 6$ -Desaturase-Polypeptid oder ein funktionell äquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Polypeptid mit enzymatischer Aktivität sein oder eine antigene Polypeptidsequenz mit deren Hilfe ein Nachweis auf  $\Delta 6$ -Desaturase-Expression mög-  
35 lich ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulative Proteinsequenz, wie z.B. ein Signalsequenz für das ER, das das  $\Delta 6$ -Desaturase-Protein an den gewünschten Wirkort leitet.

40 Vorteilhaft können die  $\Delta 6$ -Desaturase-Gene im erfindungsgemäßen Verfahren mit weiteren Genen der Fettsäurebiosynthese kombiniert werden. Beispiele für derartige Gene sind die Acetyltransferasen, weitere Desaturasen oder Elongasen ungesättigter oder gesättigter Fettsäuren wie in WO 00/12720 beschrieben. Für die in-vivo und  
45 speziell in-vitro Synthese ist die Kombination mit z.B. NADH-Cytochrom B5 Reduktasen vorteilhaft, die Reduktionsäquivalente aufnehmen oder abgeben können.

## 11

- Unter den im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Proteine sind Proteine zu verstehen, die eine in der Sequenz SEQ ID NO: 2 dargestellte Aminosäuresequenz oder eine daraus durch Substitution, Inversion, Insertion oder Deletion von einem oder
- 5 mehreren Aminosäureresten erhältliche Sequenz enthalten, wobei die enzymatische Aktivität des in SEQ ID NO: 2 dargestellten Proteins erhalten bleibt bzw. nicht wesentlich reduziert wird. Unter nicht wesentlich reduziert sind alle Enzyme zu verstehen, die noch mindestens 10 %, bevorzugt 20 %, besonders bevorzugt
- 10 30 % der enzymatischen Aktivität des Ausgangsenzyms aufweisen. Dabei können beispielsweise bestimmte Aminosäuren durch solche mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften (Raumerfüllung, Basizität, Hydrophobizität etc.) ersetzt werden. Beispielsweise werden Argininreste gegen Lysinreste, Valinreste gegen Isoleucin-
- 15 reste oder Asparaginsäurereste gegen Glutaminsäurereste ausgetauscht. Es können aber auch ein oder mehrere Aminosäuren in ihrer Reihenfolge vertauscht, hinzugefügt oder entfernt werden, oder es können mehrere dieser Maßnahmen miteinander kombiniert werden.
- 20
- Unter Derivaten sind auch funktionelle Äquivalente zu verstehen, die insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten für  $\Delta 6$ -Desaturase codierende Sequenz beinhalten, welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigen, das
- 25 heißt das deren enzymatische Aktivität nicht wesentlich reduziert ist. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch
- 30 Modifikation der  $\Delta 6$ -Desaturase Nukleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen codierenden Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.
- 35 Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren Funktion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, abgeschwächt (= nicht wesentlich reduziert) oder verstärkt ist (= Enzymaktivität ist stärker als die Aktivität des Ausgangsenzym, das heißt Aktivität ist höher als 100 %, bevorzugt höher
- 40 als 110 %, besonders bevorzugt höher als 130 %).

Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten oben genannten Nukleinsäuresequenzen werden vorteilhaft zum Einbringen in einen Wirtsorganismus in eine Expressionskassette inseriert.

- 45 Die Nukleinsäuresequenzen können jedoch auch direkt in den Wirtsorganismus eingebracht werden. Die Nukleinsäuresequenz kann dabei vorteilhaft beispielsweise eine DNA- oder cDNA-Sequenz sein.

## 12

Zur Insertion in eine Expressionskassette geeignete codierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die für eine  $\Delta 6$ -Desaturase mit den oben beschriebenen Sequenzen codieren und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Fettsäuren, Ölen oder

- 5 Lipiden mit Doppelbindungen in  $\Delta 6$ -Position verleihen. Diese Sequenzen können homologen oder heterologen Ursprungs sein.

- Unter einer Expressionskassette (= Nukleinsäurekonstrukt oder -fragment) ist die in SEQ ID NO: 1 genannte Sequenz, die sich
- 10 als Ergebnis des genetischen Codes und/oder deren funktionellen oder nicht funktionellen Derivate zu verstehen, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen vorteilhafterweise zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft wurden und welche die Expression der codierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern.
- 15 Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, daß das Gen erst nach Induktion exprimiert und/oder überexprimiert wird, oder daß es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird. Beispielsweise
- 20 handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen um Sequenzen an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen oder anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Struktur-
- 25 genen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so daß die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es wurden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die Nukleinsäuresequenz oder dessen
- 30 Derivate inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Stattdessen wurde die natürliche Regulationssequenz so mutiert, daß keine Regulation mehr erfolgt und/oder die Genexpression gesteigert wird. Diese veränderten Promotoren können in Form von Teilsequenzen (= Promotor mit
- 35 Teilen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen) auch allein vor das natürliche Gen zur Steigerung der Aktivität gebracht werden. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression
- 40 der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Das  $\Delta 6$ -Desaturase-Gen kann in einer oder mehreren Kopien in der Expressionskassette (= Genkonstrukt) enthalten sein. Auch
- 45 eventuell mit exprimierte Gene, die vorteilhaft an der Fettsäurebiosynthese beteiligt sind, können in einer oder mehreren Kopien in der Expressionskassette vorhanden sein.

## 13

- Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei wie oben beschrieben vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der
- 5 Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.
- 10 Als Promotoren in der Expressionskassette sind grundsätzlich alle Promotoren geeignet, die die Expression von Fremdgenen in Organismen vorteilhaft in Pflanzen oder Pilzen steuern können. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder Promotoren, die beispielsweise aus einem Pflanzen-
- 15 virus entstammen. Vorteilhafte Regulationssequenzen für das erfindungsgemäße Verfahren sind beispielsweise in Promotoren wie *cos-*, *tac-*, *trp-*, *tet-*, *trp-tet-*, *lpp-*, *lac-*, *lpp-lac-*, *lacI<sup>q</sup>-*, *T7-*, *T5-*, *T3-*, *gal-*, *trc-*, *ara-*, *SP6-*,  $\lambda$ -P<sub>R</sub>- oder im  $\lambda$ -P<sub>L</sub>-Promotor enthalten, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien
- 20 Anwendung finden. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen sind beispielsweise in den gram-positiven Promotoren *amy* und *SPO2*, in den Hefe- oder Pilzpromotoren *ADC1*, *MF $\alpha$* , *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH*, *TEF*, *rp28*, *ADH* oder in den Pflanzenpromotoren wie *CaMV/35S* [Franck et al., Cell 21(1980) 285-294], *RUBISCO SSU*, *OCS*, *B33*,
- 25 *nos* (= Nopalin Synthase Promotor) oder im Ubiquitin-Promotor enthalten. Die Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen  $\Delta 6$ -Desaturase-Gens in den Organismen vorteilhaft in den Pflanzen zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann.
- 30 Derartige vorteilhafte Pflanzenpromotoren sind beispielsweise der *PRP1*-Promotor [Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366], ein durch Benzensulfonamid-induzierbarer (EP 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2,397-404), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor
- 35 (WO 95/19443), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor. Weitere Pflanzenpromotoren sind beispielsweise der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel, der *ST-LSI* Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J.
- 40 8 (1989) 2445-245), der Promotor der Phosphoribosylpyrophosphat Amidotransferase aus *Glycine max* (siehe auch Genbank Accession Nummer U87999) oder ein Nodien-spezifischen Promotor wie in EP 249676 können vorteilhaft verwandt werden. Vorteilhaft sind insbesondere solche pflanzliche Promotoren, die die Expression in
- 45 Geweben oder Pflanzenteilen/-organen sicherstellen, in denen die Fettsäurebiosynthese bzw. dessen Vorstufen stattfindet wie beispielsweise im Endosperm oder im sich entwickelnden Embryo. Ins-

## 14

besondere zu nennen sind vorteilhafte Promotoren, die eine samen-spezifische Expression gewährleisten wie beispielsweise der USP-Promotor oder Derivate davon, der LEB4-Promotor, der Phaseolin-Promotor oder der Napin-Promotor. Der erfindungsgemäß aufgeführte  
5 und besonders vorteilhafte USP-Promotor oder dessen Derivate vermitteln in der Samenentwicklung eine sehr früh Genexpression (Baeumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3): 459-67). Weitere vorteilhafte samenspezifische Promotoren, die für monokotyle und dikotyle Pflanzen verwendet werden können, sind die für Dikotyle  
10 geeignete Promotoren wie ebenfalls beispielhaft ausgeführte Napingen-Promotor aus Raps (US5,608,152), der Oleosin-Promotor aus Arabidopsis (WO98/45461), der Phaseolin-Promotor aus Phaseolus vulgaris (US5,504,200), der Bce4-Promotor aus Brassica (WO91/13980) oder der Leguminosen B4-Promotor (LeB4, Baeumlein  
15 et al., Plant J., 2, 2, 1992: 233 - 239) oder für Monokotyle geeignete Promotoren wie die Promotoren des lpt2- oder lpt1-Gens aus Gerste (WO95/15389 und WO95/23230) oder die Promotoren des Gersten Hordein-Gens, des Reis Glutelin-Gens, des Reis Oryzin-Gens, des Reis Prolamin-Gens, des Weizen Gliadin-  
20 Gens, des Weizen Glutelin-Gens, des Mais Zein-Gens, des Hafer Glutelin-Gens, des Sorghum Kasirin-Gens oder des Roggen Secalin-Gens, die in WO99/16890 beschrieben werden.

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die  
25 die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von Fettsäuren, Ölen und Lipiden bzw. deren Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine samenspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor des Napin-Gens aus Raps  
30 (US 5,608,152), des USP-Promotor aus Vicia faba (USP=unbekanntes Samenprotein, Baeumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3): 459-67), des Oleosin-Gens aus Arabidopsis (WO98/45461), des Phaseolin-Promotors (US 5,504,200) oder der Promotor des Legumin B4-Gens (LeB4; Baeumlein et al., 1992, Plant Journal, 2 (2):  
35 233-9). Weiterhin sind zu nennen Promotoren, wie der des lpt2 oder lpt1-Gens aus Gerste (WO95/15389 und WO95/23230), die in monokotylen Pflanzen samenspezifische Expression vermitteln.

In der Expressionskassette (= Genkonstrukt, Nukleinsäurekon-  
40 strukt) können wie oben beschrieben noch weitere Gene, die in die Organismen eingebracht werden sollen, enthalten sein. Diese Gene können unter getrennter Regulation oder unter der gleichen Regulationsregion wie das  $\Delta 6$ -Desaturase-Gen liegen. Bei diesen Genen handelt es sich beispielsweise um weitere Biosynthesegene  
45 vorteilhaft der Fettsäurebiosynthese, die eine gesteigerte Synthese ermöglichen. Beispielsweise seien die Gene für die  $\Delta 15$ -,  $\Delta 12$ -,  $\Delta 9$ -,  $\Delta 5$ -,  $\Delta 4$ -Desaturase, die verschiedenen Hydroxylasen,

## 15

die Acyl-ACP-Thioesterasen,  $\beta$ -Ketoacyl-Synthasen oder  $\beta$ -Ketoacyl-Reductasen genannt. Vorteilhaft werden die Desaturasegene im Nukleinsäurekonstrukt verwendet.

5 Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen wie die oben genannten für die erfindungsgemäße Expressionskassette und das erfindungsgemäße Verfahren, wie unten beschrieben, verwendet werden. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

10

Es können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung gelesen wird und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente

15 (= erfindungsgemäße Nukleinsäuren) miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Poly-

20 linker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zum Wirtsorganismus beispielsweise zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine DNA-Sequenz, die für ein im er-

25 findungsgemäßen Verfahren verwendetes  $\Delta 6$ -Desaturase-Gen codiert und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

35 Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, -primer-repair-, Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, -chewing-back- oder Auffüllen von Überhängen für -bluntends-, können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

45



Von Bedeutung für eine vorteilhafte hohe Expression kann u.a. das Anhängen des spezifischen ER-Retentionssignals SEKDEL sein (Schouten, A. et al., Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781-792), die durchschnittliche Expressionshöhe wird damit verdreifacht bis  
5 vervierfacht. Es können auch andere Retentionssignale, die natürlicherweise bei im ER lokalisierten pflanzlichen und tierischen Proteinen vorkommen, für den Aufbau der Kassette eingesetzt werden.

- 10 Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J.3 (1984),  
15 835 ff) oder entsprechende funktionelle Äquivalente.

- Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten  $\Delta 6$ -Desaturase-DNA-Sequenz sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen  
20 Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor  
25 Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben werden.

- Die DNA Sequenz codierend für eine  $\Delta 6$ -Desaturase aus *Phsyco-*  
30 *mitrella patens* beinhaltet alle Sequenzmerkmale, die notwendig sind, um eine dem Ort der Fettsäure-, Lipid- oder Ölbiosynthese korrekte Lokalisation zu erreichen. Daher sind keine weiteren Targetingsequenzen per se notwendig. Allerdings kann eine solche Lokalisation wünschenswert und vorteilhaft sein und daher künst-  
35 lich verändert oder verstärkt werden, sodaß auch solche Fusionskonstrukte eine bevorzugte vorteilhafte Ausführungsform der Erfindung sind.

- Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in  
40 Plastiden gewährleisten. Unter bestimmten Umständen kann auch ein Targeting in andere Kompartimente (referiert: Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996), 285-423) z.B. in die Vakuole, in das Mitochondrium, in das Endoplasmatische Retikulum (ER), Peroxisomen, Lipidkörper oder durch ein Fehlen entsprechender  
45 operativer Sequenzen ein Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytosol, wünschenswert sein.

## 17

Vorteilhafterweise werden die für  $\Delta 6$ -Desaturase-Gene codierenden Nukleinsäuresequenzen zusammen mit mindestens einem Reportergen in eine Expressionskassette kloniert, die in den Organismus über einen Vektor oder direkt in das Genom eingebracht wird. Dieses Reportergen sollte eine leichte Detektierbarkeit über einen Wachstums-, Fluoreszenz-, Chemo-, Biolumineszenz- oder Resistenz-assay oder über eine photometrische Messung ermöglichen. Beispielsweise seien als Reportergene Antibiotika- oder Herbizid-resistenzgene, Hydrolasegene, Fluoreszenzproteingene, Biolumineszenzgene, Zucker- oder Nukleotidstoffwechselgene oder Biosynthesegene wie das Ura3-Gen, das Ilv2-Gen, das Luciferasegen, das  $\beta$ -Galactosidasegen, das gfp-Gen, das 2-Desoxyglucose-6-phosphat-Phosphatasegen, das  $\beta$ -Glucuronidase-Gen,  $\beta$ -Lactamasegen, das Neomycinphosphotransferasegen, das Hygromycinphosphotransferasegen oder das BASTA (= Gluphosinatresistenz)-Gen genannt. Diese Gene ermöglichen eine leichte Meßbarkeit und Quantifizierbarkeit der Transkriptionsaktivität und damit der Expression der Gene. Damit lassen sich Genomstellen identifizieren, die eine unterschiedliche Produktivität zeigen.

20 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der codierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden codierenden Sequenz für die  $\Delta 6$ -Desaturase DNA Sequenz operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, codierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der codierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation in Plastiden. Aber auch Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (= ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten sind bei Bedarf einsetzbar sowie Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693-8711).

40 Eine Expressionskassette kann beispielsweise einen konstitutiven Promotor (bevorzugt den USP- oder Napin-Promotor), das zu exprimierende Gen und das ER-Retentionssignal enthalten. Als ER-Retentionssignal wird bevorzugt die Aminosäuresequenz KDEL (Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin) verwendet.

## 18

- Die Expressionskassette wird zur Expression in einem prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtsorganismus beispielsweise einem Mikroorganismus wie einem Pilz oder einer Pflanze vorteilhafterweise in einen Vektor wie beispielsweise einem Plasmid, einem Phagen oder sonstiger DNA inseriert, der eine optimale Expression der Gene im Wirtsorganismus ermöglicht. Geeignete Plasmide sind beispielsweise in *E. coli* pLG338, pACYC184, pBR-Serie wie z.B. pBR322, pUC-Serie wie pUC18 oder pUC19, M13mp-Serie, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III<sup>113</sup>-B1,  $\lambda$ gt11 oder pBdCI, in *Streptomyces* pIJ101, pIJ364, pIJ702 oder pIJ361, in *Bacillus* pUB110, pC194 oder pBD214, in *Corynebacterium* pSA77 oder pAJ667, in Pilzen pALS1, pIL2 oder pBB116, weitere vorteilhafte Pilzvektoren werden von Romanos, M.A. et al., [(1992) "Foreign gene expression in yeast: a review", *Yeast* 8: 423-488] und von van den Hondel, C.A.M.J.J. et al. [(1991) "Heterologous gene expression in filamentous fungi"] sowie in *More Gene Manipulations in Fungi* [J.W. Bennet & L.L. Lasure, eds., p. 396-428: Academic Press: San Diego] und in "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi" [van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) in: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, Peberdy, J.F. et al., eds., p. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge] beschrieben. Vorteilhafte Hefevektoren sind beispielsweise 2 $\mu$ M, pAG-1, YEp6, YEp13 oder pEMBLyE23. Beispiele für Algen- oder Pflanzenpromotoren sind pLGV23, pGHlac<sup>+</sup>, pBIN19, pAK2004, pVKH oder pDH51 (siehe Schmidt, R. and Willmitzer, L., 1988). Die oben genannten Vektoren oder Derivate der vorstehend genannten Vektoren stellen eine kleine Auswahl der möglichen Plasmide dar. Weitere Plasmide sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus dem Buch *Cloning Vectors* (Eds. Pouwels P.H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018) entnommen werden. Geeignete pflanzliche Vektoren werden unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S.71-119 beschrieben. Vorteilhafte Vektoren sind sog. shuttle-Vektoren oder binäre Vektoren, die in *E. coli* und *Agrobacterium* replizieren.

- Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren wie beispielsweise Phagen, Viren wie SV40, CMV, Baculovirus, Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Phagemide, Cosmide, lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden, bevorzugt ist eine chromosomale Replikation.

## 19

In einer weiteren Ausgestaltungsform des Vektors kann die erfindungsgemäße Expressionskassette auch vorteilhafterweise in Form einer linearen DNA in die Organismen eingeführt werden und über heterologe oder homologe Rekombination in das Genom des Wirtsorganismus integriert werden. Diese lineare DNA kann aus einem linearisierten Plasmid oder nur aus der Expressionskassette als Vektor oder den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen bestehen.

10 In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform kann die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz auch alleine in einen Organismus eingebracht werden.

Sollen neben der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz weitere Gene in den Organismus eingeführt werden, so können alle zusammen mit einem Reportergen in einem einzigen Vektor oder jedes einzelne Gen mit einem Reportergen in je einem Vektor oder mehrere Gene zusammen in verschiedenen Vektoren in den Organismus eingebracht werden, wobei die verschiedenen Vektoren gleichzeitig oder sukzessive eingebracht werden können.

Der Vektor enthält vorteilhaft mindestens eine Kopie der Nukleinsäuresequenzen, die für eine  $\Delta 6$ -Desaturase codieren, und/oder der Expressionskassette.

25

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Transformationsvektor pRT ((a) Toepfer et al., 1993, Methods Enzymol., 217: 66-78; (b) Toepfer et al. 1987, Nucl. Acids. Res. 15: 5890 ff.) eingebaut werden.

30

Alternativ kann ein rekombinanter Vektor (= Expressionsvektor) auch in-vitro transkribiert und translatiert werden, z.B. durch Nutzung des T7 Promotors und der T7 RNA Polymerase.

35 In Prokaryoten verwendete Expressionsvektoren nutzen häufig induzierbare Systeme mit und ohne Fusionsproteinen bzw Fusions-oligopeptiden, wobei diese Fusionen sowohl N-terminal als auch C-terminal oder anderen nutzbaren Domänen eines Proteins erfolgen können. Solche Fusionsvektoren dienen in der Regel dazu: i.) die Expressionsrate der RNA zu erhöhen ii.) die erzielbare Proteinsyntheserate zu erhöhen, iii.) die Löslichkeit des Proteins zu erhöhen, iv.) oder die Reinigung durch einen für die Affinitätschromatographie nutzbare Bindesequenz zu vereinfachen. Häufig werden auch proteolytische Spaltstellen über Fusionsproteine eingeführt, was die Abspaltung eines Teils des Fusionsproteins auch der Reinigung ermöglicht. Solche Erkennungssequenzen für

## 20

Proteasen erkennen sind z.B. Faktor Xa, Thrombin und Entero-kinase.

Typische vorteilhafte Fusions- und Expressionsvektoren sind pGEX  
5 [Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. and Johnson, K.S. (1988) *Gene* 67: 31-40], pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) and pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) welches Glutathion S-transferase beinhaltet (GST), Maltose Bindeprotein, oder Protein A.

- 10 Weitere Beispiele für E. coli Expressionsvektoren sind pTrc [Amann et al., (1988) *Gene* 69:301-315] und pET Vektoren [Studier et al., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 60-89; Stratagene, Amsterdam, Niederlande].

15

Weitere vorteilhafte Vektoren zur Verwendung in Hefe sind pYepSec1 (Baldari, et al., (1987) *Embo J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan and Herskowitz, (1982) *Cell* 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al., (1987) *Gene* 54:113-123), and pYES-Derivate (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektoren für die Nutzung in filamentösen Pilzen sind beschrieben in: van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, J.F. Peberdy, et al., eds., p. 1-28, Cambridge University Press:  
25 Cambridge.

Alternativ können auch vorteilhaft Insektenzellexpressionsvektoren genutzt werden z.B. für die Expression in Sf 9 Zellen. Dies sind z.B. die Vektoren der pAc Serie (Smith et al. (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) und der pVL series (Lucklow and Summers (1989) *Virology* 170:31-39).

Des weiteren können zur Genexpression vorteilhaft Pflanzenzellen oder Algenzellen genutzt werden. Beispiele für Pflanzenexpressionsvektoren finden sich in Becker, D., et al. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", *Plant Mol. Biol.* 20: 1195-1197 oder in Bevan, M.W. (1984) "Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation", *Nucl. Acid. Res.* 12: 8711-8721.

40

Weiterhin können die für die  $\Delta 6$ -Desaturase codierenden Nukleinsäuresequenzen in Säugerzellen exprimiert werden. Beispiel für entsprechende Expressionsvektoren sind pCDM8 und pMT2PC genannt in: Seed, B. (1987) *Nature* 329:840 oder Kaufman et al.  
45 (1987) *EMBO J.* 6: 187-195). Dabei sind vorzugsweise zu nutzende Promotoren viralen Ursprungs wie z.B. Promotoren des Polyoma, Adenovirus 2, Cytomegalovirus oder Simian Virus 40. Weitere

## 21

prokaryotische und eukaryotische Expressionssysteme sind genannt in Kapitel 16 und 17 in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 5 1989.

Das Einbringen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, der Expressionskassette oder des Vektors in Organismen beispielsweise in Pflanzen kann prinzipiell nach allen dem Fachmann 10 bekannten Methoden erfolgen.

Für Mikroorganismen kann der Fachmann entsprechende Methoden den Lehrbüchern von Sambrook, J. et al. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, von 15 F.M. Ausubel et al. (1994) *Current protocols in molecular biology*, John Wiley and Sons, von D.M. Glover et al., *DNA Cloning Vol.1*, (1995), IRL Press (ISBN 019-963476-9), von Kaiser et al. (1994) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press oder Guthrie et al. *Guide to Yeast Genetics and Molecular 20 Biology*, *Methods in Enzymology*, 1994, Academic Press entnehmen.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus 25 Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone - die sogenannte particle bombardment Methode -, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch Agrobacterium vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, in: *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. 35 Wu, Academic Press (1993) 128-143 sowie in Potrykus *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991) 205-225 beschrieben. Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., *Nucl. Acids Res.* 40 12 (1984) 8711). Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B. von Tabakpflanzen, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet 45 und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden. Die Transformation von Pflanzen mit Agrobacterium tumefaciens wird beispielsweise von Höfgen und Willmitzer in *Nucl. Acid Res.*

(1988) 16, 9877 beschrieben oder ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38.

5

Mit einem wie oben beschriebenen Expressionsvektor transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen wie Testpflanzen wie Arabidopsis oder Kulturpflanzen wie Getreide, Mais, Hafer, Roggen, Gerste, Weizen,

- 10 Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Triticale, Reis, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Kaffee, Kakao, Tee, Karotte, Paprika, Raps, Tapioka, Maniok, Pfeilwurz, Tagetes, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, insbesondere von Öl-haltigen Kulturpflanzen,
- 15 wie Soja, Erdnuß, Rizinus, Borretsch, Lein, Sonnenblume, Canola, Baumwolle, Flachs, Raps, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*) oder Kakaobohne verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert
- 20 werden.

Die genetisch veränderten Pflanzenzellen können über alle dem Fachmann bekannten Methoden regeneriert werden. Entsprechende Methoden können den oben genannten Schriften von S.D. Kung und

- 25 R. Wu, Potrykus oder Höfgen und Willmitzer entnommen werden.

Als Organismen bzw. Wirtsorganismen für die erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die verwendete Expressionskassette oder den verwendeten Vektor eignen sich prinzipiell

- 30 vorteilhaft alle Organismen, die in der Lage sind Fettsäuren speziell ungesättigte Fettsäuren zu synthetisieren bzw. für die Expression rekombinanter Gene geeignet sind. Beispielhaft seien Pflanzen wie Arabidopsis, Asteraceae wie Calendula oder Kulturpflanzen wie Soja, Erdnuß, Rizinus, Sonnenblume, Mais, Baumwolle, Flachs, Raps, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*) oder Kakaobohne, Mikroorganismen wie Pilze beispielsweise die Gattung *Mortierella*, *Saprolegnia* oder *Pythium*, Bakterien wie die Gattung *Escherichia*, Cyanobakterien, Ciliaten, Thrausto- oder Schizichytrien, Algen oder Protozoen wie Dino-
- 40 flagellaten wie *Cryptocodium* genannt. Bevorzugt werden Organismen, die natürlicherweise Öle in größeren Mengen synthetisieren können wie Pilze der Gattungen *Mortierella* oder *Pythium* wie *Mortierella alpina*, *Pythium insidiosum* oder Pflanzen wie Soja, Raps, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor, Rizinus,
- 45 Calendula, Erdnuß, Kakaobohne oder Sonnenblume, besonders bevorzugt werden Soja, Raps, Sonnenblume, Rizinus, *Mortierella* oder

## 23

Pythium. Prinzipiell sind als Wirtsorganismen auch transgene Tiere geeignet beispielsweise *C. elegans*.

Nutzbare Wirtszellen sind weiterhin genannt in: Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).

Verwendbare Expressionsstämme z.B. solche, die eine geringere Proteaseaktivität aufweisen sind beschrieben in: Gottesman, S., 10 *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128.

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression des  $\Delta 6$ -Desaturase-Gens spezifisch in den Blättern, in den Samen, den 15 Knollen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche Fettsäuren, Öle oder Lipide mit  $\Delta 6$ -Doppelbindungen überproduzierenden transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile, sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ein bevorzugter erfindungsgemäßer Gegenstand sind transgene Pflanzen beispielsweise Kulturpflanzen wie 20 Mais, Hafer, Roggen, Weizen, Gerste, Mais, Reis, Soja, Zuckerrübe, Canola, Triticale, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Tabak, Tomate, Kaffee, Kakao, Tee, Karotte, Paprika, Raps, Tapioka, Maniok, Pfeilwurz, Tagetes, Alfalfa, Salat und den verschiedenen 25 Baum-, Nuß- und Weinspezies, Kartoffel, insbesondere Öl-haltige Kulturpflanzen, wie Soja, Erdnuß, Rizinus, Borretsch, Lein, Sonnenblume, Canola, Baumwolle, Flachs, Raps, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*) oder Kakaobohne, Testpflanzen wie *Arabidopsis* oder sonstige Pflanzen wie Moose oder Algen ent- 30 haltend eine erfindungsgemäße funktionelle Nukleinsäuresequenz oder eine funktionelle Expressionskassette. Funktionell bedeutet hierbei, daß ein enzymatisch aktives Enzym gebildet wird.

Die Expressionskassette oder die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen enthaltend eine  $\Delta 6$ -Desaturasegenesequenz kann darüber 35 hinaus auch zur Transformation der oben beispielhaft genannten Organismen wie Bakterien, Cyanobakterien, filamentösen Pilzen, Ciliaten, Tiere oder Algen mit dem Ziel einer Erhöhung des Gehaltes an Fettsäuren, Ölen oder Lipiden  $\Delta 6$ -Doppelbindungen ein- 40 gesetzt werden. Bevorzugte transgene Organismen sind Bakterien, Cyanobakterien, filamentöse Pilze oder Algen.

Unter transgenen Organismen sind Organismen zu verstehen, die eine Fremde aus einem anderen Organismus stammende Nuklein- 45 säure, die für eine im erfindungsgemäßen Verfahren verwendete  $\Delta 6$ -Desaturase codiert, enthalten. Unter transgenen Organismen sind auch Organismen zu verstehen, die eine Nukleinsäure, die



- aus demselben Organismus stammt und die für eine  $\Delta 6$ -Desaturase codiert, enthält, wobei diese Nukleinsäure als zusätzliche Genkopie enthalten ist oder nicht in der natürlichen Nukleinsäureumgebung des  $\Delta 6$ -Desaturase-Gens enthalten ist. Transgene
- 5 Organismen sind auch Organismen bei denen die natürliche 3'- und/oder 5'-Region des  $\Delta 6$ -Desaturase-Gens durch gezielte gentechnologische Veränderungen gegenüber dem Ausgangsorganismus verändert wurde. Bevorzugt sind transgene Organismen bei denen eine Fremd-DNA eingebracht wurde. Besonders bevorzugt sind trans-
- 10 gene Pflanzen, in die Fremd-DNA eingebracht wurde. Unter transgenen Pflanzen sind einzelne Pflanzenzellen und deren Kulturen wie beispielsweise Kalluskulturen auf Festmedien oder in Flüssigkultur, Pflanzenteile und ganze Pflanzen zu verstehen.
- 15 Ein weiterer Erfindungsgegenstand sind transgene Organismen ausgewählt aus der Gruppe Pflanzen, Pilze, Ciliaten, Algen, Bakterien, Cyanobakterien oder Tiere, bevorzugt transgene Pflanzen oder Algen, die mindestens eine isolierte Nukleinsäuresequenz enthalten, die für ein Polypeptid mit  $\Delta 6$ -Desaturase-
- 20 aktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe:
- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz,
  - 25 b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1 ableiten
  - c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2
  - 30 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 50 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist.
- 35 Erhöhung des Gehaltes von Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit  $\Delta 6$ -Doppelbindungen bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung beispielsweise die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung durch funktionelle Überexpression des  $\Delta 6$ -Desaturase-Gens in den erfindungsgemäßen Organismen vorteil-
- 40 haft in den erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen gegenüber den nicht gentechnisch modifizierten Ausgangspflanzen zumindest für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.
- Der Biosyntheseort von Fettsäuren, Ölen oder Lipiden beispielsweise ist im allgemeinen der Samen oder Zellschichten des Samens,
- 45 so daß eine samenspezifische Expression des  $\Delta 6$ -Desaturase-Gens sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Biosynthese

## 25

von Fettsäuren, Ölen oder Lipiden nicht auf das Samengewebe beschränkt sein muß, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze - beispielsweise in Epidermiszellen oder in den Knollen-gewebe spezifisch erfolgen kann.

5

Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen  $\Delta 6$ -Desaturase-Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.

- 10 Die Wirksamkeit der Expression des  $\Delta 6$ -Desaturase-Gens kann beispielsweise *in vitro* durch Sproßmeristemvermehrung ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des  $\Delta 6$ -Desaturase-Gens und deren Auswirkung auf die Fettsäure-, Öl- oder Lipidbiosyntheseleistung an Testpflanzen in Gewächshaus-  
15 versuchen getestet werden.

- Gegenstand der Erfindung sind wie oben beschrieben transgene Pflanzen, transformiert mit einer Nukleinsäuresequenz, die für eine  $\Delta 6$ -Desaturase codiert, einem Vektor oder einer Expressions-  
20 kassette enthaltend eine  $\Delta 6$ -Desaturase-Gensequenz oder mit dieser hybridisierende DNA-Sequenzen, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen wie oben beschrieben.

- 25 Pflanzen im Sinne der Erfindung sind mono- und dikotyle Pflanzen oder Algen.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

- 30 - Verwendung einer  $\Delta 6$ -Desaturase-DNA-Gensequenz mit der in SEQ ID NO:1 genannten Sequenz oder mit dieser hybridisierende DNA-Sequenzen zur Herstellung von Pilzen, Bakterien, Tieren oder Pflanzen bevorzugt Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit  $\Delta 6$ -Doppelbindungen durch  
35 Expression dieser  $\Delta 6$ -Desaturase DNA-Sequenz in Pflanzen.
- Verwendung der Proteine mit den Sequenzen SEQ ID NO: 2 zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren in Pflanzen, Pilzen, Bakterien oder Tieren bevorzugt Pflanzen.

40

45

## 26

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert:

## Beispiele

5 Beispiel 1: Allgemeine Klonierungsverfahren und Anzuchtungsverfahren:

- Die Klonierungsverfahren wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer  
10 von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylon Membranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von Escherichia coli Zellen, Anzucht von Organismen und die Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt.  
15 Das Protonema von Physcomitrella patens (= P. patens) wurde in Flüssigmedium, wie von Reski et al. (Mol. Gen. Genet., 244, 1994: 352-359) beschrieben, angezogen.

Beispiel 2: Sequenzanalyse rekombinanter DNA

- 20 Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma ABI nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467). Fragmente resultierend aus einer Polymerase Kettenreaktion wurden zur Vermeidung von Polymerasefehlern in zu  
25 exprimierenden Konstrukten sequenziert und überprüft.

Beispiel 3: Lipidanalyse aus dem Protonema von P. patens und aus Hefezellen

- 30 Die Lipide wurden mit Chloroform/Methanol wie bei Siebertz et al. (Eur. J. Biochem., 101, 1979: 429-438) beschrieben aus dem Protonema von S. patens oder aus Hefezellen extrahiert und über Dünnschichtchromatographie (= TLC) mit Diethylether gereinigt. Die erhaltenen Fettsäuren wurden zu den entsprechenden  
35 Methylestern transmethyliert und mit Gaschromatographie (= GC) analysiert. Die verschiedenen Methylester wurden mit den entsprechenden Standards identifiziert. Entsprechende Fettsäurepyrrolididen wurden, wie bei Anderson et al. (Lipids, 9, 1974: 185-190) beschrieben, erhalten und mit GC-MS bestimmt.  
40

Beispiel 4: Funktionelle Expression der  $\Delta 6$ -Desaturase cDNA von *P. patens* in Hefen

Die Expression-Experimente in Hefen wurden mit PPDES6-cDNA durchgeführt. Knock-out-Experimente hatten gezeigt (Daten und Versuchsdurchführung nicht gezeigt bzw. beschrieben), daß der Knock-out zu einem Verlust an 20:3<sup>11,14,17</sup>-, 20:4<sup>5,8,11,14</sup>-, 20:4<sup>5,11,14,17</sup>- und 20:5<sup>5,8,11,14,17</sup>-Fettsäuren führt. Gleichzeitig steigen die 18:2<sup>9,12</sup>- und 18:3<sup>9,12,15</sup>-Fettsäuren an. Für die Expression in Hefe wurde der PPDES6-cDNA in den Hefe-Expressionsvektor pYES2 (Invitrogen) subkloniert. Der erhaltene Vektor erhielt die Bezeichnung pYESdelta6. Mit pYES2 (Kontrolle) und pYESdelta6 ( $\Delta 6$ -Desaturase-cDNA) transformierte Hefekulturen wurden auf Uracil-dop-out Medium mit 2 % Raffinose und 1 % Tergitol NP-40 (zur Stabilisierung der Fettsäuren) angezogen. Für die Expression wurden die Zellen mit Galactose (Endkonzentration 2 %) bis zu einer optischen Dichte (= OD) von 0,5 bei 600nm angezogen. In Fütterungsexperimenten wurden Fettsäuren in 5 % Tergitol solubilisiert und mit einer Endkonzentration von 0,0003 % zugesetzt. Die Ergebnisse der Expression sind Tabelle I zu entnehmen. Die Synthese von Fettsäuren mit einer Doppelbindung an Position 6 ist nur in Gegenwart des Expressionskonstrukts mit der  $\Delta 6$ -Desaturase-cDNA möglich. Dieses  $\Delta 6$ -Desaturase-Enzym hat eine größere Aktivität gegenüber Fettsäuren, die schon eine Doppelbindung an Position 9 oder 12 (Bezug auf Kohlenstoffatom in der Kette) enthalten. Es wurden die Fettsäuremethylester des gesamten Lipids der Hefen mit GC analysiert. Die einzelnen synthetisierten Fettsäuren werden in der Tabelle in Mol-% der gesamten Fettsäuren angegeben.

Tabelle I: Fettsäurezusammensetzung in transformierten Hefen gegenüber der Kontrolle

Gesamt Fettsäure (%)				
	pYES2		pYESdelta6	
35 Fettsäuren	-	-	+ 18:2 <sup>9,12</sup>	+18:3 <sup>9,12,15</sup>
16:0	16,4	16,1	23,8	25,8
16:1 <sup>9</sup>	54,0	55,5	38,1	31,4
16:2 <sup>6,9</sup>	-	4,2	1,7	-
40 18:0	3,2	2,4	4,0	-
18:1 <sup>9</sup>	24,9	19,7	19,1	19,2
18:2 <sup>6,9</sup>	-	0,6	0,2	-
18:2 <sup>9,12</sup>	-	-	8,5	-
45 18:3 <sup>6,9,12</sup>	-	-	4,0	-
18:3 <sup>9,12,15</sup>	-	-	-	11,7
18:4 <sup>6,9,12,15</sup>	-	-	-	3,0

# Beispiel 5: Transformation von *P. patens*

Die Polyethylenglycol vermittelte direkte DNA-Transformation von Protoplasten wurde, wie von Schäfer et al. (Mol. Gen. Genet., 5 226, 1991: 418-424) beschrieben, durchgeführt. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf G418-enthaltenden Medium (Girke et al., The Plant Journal, 15, 1998: 39-48).

# Beispiel 6: Isolierung von $\Delta 6$ -Desaturase cDNA und genomischen Clonen von *P. patens*

Mit Hilfe eines PCR-Ansatzes mit den folgenden degenerierten Oligonukleotiden als Primer:

- 15 A: TGGTGGAA(A/G)TGGA(C/A)ICA(T/C)AA und  
B: GG(A/G)AA(A/C/G/T)A(A/G)(G/A)TG(G/A)TG(C/T)TC]

und dem folgenden Temperaturprogramm:

- 94°C, 3 min; [94°C, 20 sec; 45°C, 30 sec; 72°C, 1 min], 30 Zyklen;  
20 72°C, 5 min, wurden schließlich Fragmente einer  $\Delta 6$ -Desaturase-Gen kloniert. Für die Klonierung wurde poly(A)RNA aus 12 Tage alten *P. patens* Protonema-Kultur isoliert. Mit dieser poly(A)RNA wurde die oben beschriebene PCR durchgeführt. Fragmente der erwarteten Fragmentlänge (500 bis 600 bp) wurden in pUC18 kloniert und  
25 sequenziert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz eines PCR-Fragments zeigte Ähnlichkeiten zu bekannten  $\Delta 6$ -Desaturasen. Da bekannt war, daß *P. patens* eine  $\Delta 6$ -Desaturase besitzt, wurde angenommen, daß dieser Klon für einen Teil einer  $\Delta 6$ -Desaturase codiert.
- 30 Ein vollständiger cDNA-Klon (= PPDES6-cDNA) wurde aus einer *P. patens* cDNA-Bank von 12 Tage alten Protonemata mit Hilfe des oben genannten PCR-Fragments isoliert. Die Nukleotidsequenz wird in SEQ ID NO:1 wiedergegeben. Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist SEQ ID NO:2 zu entnehmen. Die zugehörige genomische Sequenz  
35 (= PPDES6-Gen) konnte mit Hilfe der PCR und den folgenden Oligonukleotiden als Primer isoliert werden:

C: CCGAGTCGCGGATCAGCC

D: CAGTACATTCGGTCATTCACC:

40

- Tabelle II gibt die Ergebnisse des Vergleichs zwischen der neuen *P. patens*  $\Delta 6$ -Desaturase über die gesamte Nukleinsäuresequenz mit folgenden bekannten  $\Delta 6$ -Desaturase wieder: *Borago officinalis* (U79010), *Synechocystis* sp (L11421), *Spirulina platensis* (X87094), *Caenorhabditis elegans* (AF031477), *Mortierella alpina* (WO 98/46764), *Homo sapiens* (Cho et al., J. Biol. Chem., 274, 1999: 471-477), *Rattus norvegicus* (AB021980) und *Mus musculus*

## 29

(Cho et al., J. Biol. Chem., 274, 1999: 471-477). Die Analyse wurde mit dem Gap Programm (GCG-Package, Version 9,1) und den folgenden Analysenparametern durchgeführt: scoring matrix, blosum62, gap creation penalty, 12; gap extension penalty, 4.

- 5 Die Ergebnisse geben die bestimmte Identität oder Ähnlichkeit [] in Prozent (%) im Vergleich zur *P. patens*-Sequenz wieder.

Tabelle II: Sequenzvergleich zwischen *P. patens*  $\Delta 6$ -Desaturase und anderen  $\Delta 6$ -Desaturasen

10

Sequenz	Aminosäuresequenz-Identität [Ähnlichkeit] (%)
<i>Borago officinalis</i>	31 [38]
<i>Synechocystis</i> sp.	21 [29]
15 <i>Spirulina platensis</i>	20 [29]
<i>Caenorhabditis elegans</i>	35 [43]
<i>Mortierella alpina</i>	39 [47]
<i>Homo sapiens</i>	27 [38]
20 <i>Rattus norvegicus</i>	28 [39]
<i>Mus musculus</i>	29 [39]

Beispiel 7: Klonierung der  $\Delta 6$ -Desaturase aus *Physcomitrella*  
 25 *patens*

Die genomische  $\Delta 6$ -Acyllipid-Desaturase aus *Physcomitrella patens* wurde auf Grundlage der veröffentlichten Sequenz (Girke et al., Plant J., 15, 1998: 39-48) mittels Polymerasekettenreaktion und  
 30 Klonierung modifiziert, isoliert und für das erfindungsgemäße Verfahren eingesetzt. Dazu wurde zunächst mittels Polymerasekettenreaktion unter Verwendung von zwei genspezifischen Primern ein Desaturase-Fragment isoliert und in das bei Girke et al. (siehe oben) beschriebene Desaturasegen eingesetzt.

35

Primer TG5: 5'-ccgctcgagcgagggttggtgtggagcggc und  
 Primer TG3: 5'-ctgaaatagtcttgctcc-3'

dienten zunächst zur Amplifizierung eines Genfragmentes mittels  
 40 Polymerasekettenreaktion (30 Zyklen, 30 sek. 94° V, 30 sek. 50°C, 60 sek. 72°C, 10 min Nachinkubation bei 72°C, in einem Perkin Elmer Thermocycler).

45

## 30

- a) Klonierung eines Expressionsplasmids, das die  $\Delta 6$ -Desaturase unter Kontrolle des 35S CaMV Promotors exprimiert:

Durch Primer TG5 wurde eine XhoI Schnittstelle in das  
 5 Fragment eingeführt. Ein XhoI/Eco47III Fragment wurde durch  
 Restriktion erhalten und in die bei Girke et al. beschriebene  
 PPDES6-Gensequenz nach analoger Restriktion mit XhoI/Eco47III  
 ausgetauscht. Das Konstrukt erhielt den Namen pZK. Das Insert  
 von pZK wurde als XhoI/HindIII Fragment nach Auffüllen der  
 10 HindIII-Schnittstelle mit Nukleotiden durch Behandlung mit  
 dem Klenow Fragment der DNA Polymerase I in die XhoI/SmaI  
 Schnittstellen von pRT99/35S kloniert. Das resultierende  
 Plasmid pSK enthält den 35S-Promotor [Cauliflower-Mosaik-Vi-  
 rus, Franck et al. (1980) Cell 21, 285], die  $\Delta 6$ -Desaturase  
 15 aus Moos und den 35S-Terminator im Vektor pRT.

- b) Konstruktion eines Expressionskonstruktes unter Kontrolle  
 des Napin-Promotors:

Durch Schneiden des Plasmides pSK mit XhoI, Behandlung mit  
 20 T4-DNA Polymerase und PstI-Restriktion wurde das erhaltene  
 Promotor-Desaturase-Fragment mit Terminator in den Vektor  
 pJH3 kloniert. Dazu wurde der Vektor BamHI geschnitten und  
 mit Klenow-Enzym die Überhänge aufgefüllt sowie anschließend  
 25 mit PstI nachgeschnitten. Es entstand durch Ligation des  
 Desaturase-Terminator-Fragmentes in den Vektor das Plasmid  
 pJH7, das einen Napin-Promotor beinhaltet (Scofield et al.,  
 1987, J. Biol. Chem. 262, 12202-8). Die Expressionskassette  
 aus pJH7 wurde mit Bsp120I und NotI geschnitten und in den  
 30 binären Vektor pRE kloniert. Es entstand das Plasmid pRE-  
 Ppdes6.

In einer PCR Reaktion wurde die erfindungsgemäße  
 $\Delta 6$ -Desaturase cDNA aus *P. patens* als Matrize verwendet.  
 35 Mithilfe der nachfolgend aufgeführten Oligonukleotide wurde  
 eine BamHI-Restriktionsschnittstelle vor dem Startcodon und  
 drei Adeninnukleotide als Konsensustranslationssequenz für  
 Eukaryoten in die  $\Delta 6$ -Desaturase cDNA eingeführt. Es wurde  
 ein 1512 Basenpaarfragment der  $\Delta 6$ -Desaturase amplifiziert  
 40 und sequenziert.

Pp-d6Des1: 5'- CC GGTACC aaaatggtattcgcgggcggtg -3'

Pp-d6Des2: 3'- CC GGTACC ttaactggtggttagcatgct -3'

45 Die Reaktionsgemische enthielten ca. 1 ng/micro l Matrizen  
 DNA, 0,5  $\mu$ M der Oligonukleotide und, 200  $\mu$ M Desoxy-Nukleotide  
 (Pharmacia), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25°C,

## 31

1,5 mM  $MgCl_2$ ) und 0,02 U/ $\mu$ l Pwo Polymerase (Boehringer Mannheim) und werden in einer PCR-Maschine der Firma Perkin Elmer mit folgendem Temperaturprogramm inkubiert:

- 5      Anlagerungstemperatur:            50°C, 30 sec  
      Denaturierungstemperatur:        95°C, 30 sec  
      Elongationstemperatur:           72°C, 90 sec  
      Anzahl der Zyklen:                30

- 10 c) Konstruktion eines Expressionskonstruktes unter Kontrolle des  
      USP-Promotors:  
      Das erhaltene Fragment von ca. 1,5 kB Basenpaaren wurde in  
      den mit EcoRV gespaltenen Vektor pBluescript SK- (Stratagene)  
      ligiert und stand für weitere Klonierungen als BamHI Fragment  
15      zur Verfügung.

- Für die Transformation von Pflanzen wurde ein weiterer Trans-  
formationsvektor auf Basis von pBin-USP erzeugt, der das  
BamHI-Fragment der  $\Delta 6$ -Desaturase enthält. pBin-USP ist ein  
20      Derivat des Plasmides pBin19. pBinUSP entstand aus pBin19,  
      indem in pBin19 [Bevan et al. (1980) Nucl. Acids Res. 12,  
      8711] ein USP-Promotor als EcoRI-BamHI-Fragment inseriert  
      wurde. Das Polyadenylierungssignal ist das des Gens 3 der  
25      T-DNA des Ti-Plasmides pTiACH5 (Gielen et al., (1984) EMBO  
      J. 3, 835), wobei Nukleotide 11749-11939 als PvuII-HindIII-  
      Fragment isoliert und nach Addition von SphI-Linkern an die  
      PvuII-Schnittstelle zwischen die SphI-HindIII Schnittstelle  
      des Vektors kloniert. Der USP-Promotor entspricht den Nukleo-  
30      tiden 1-684 (Genbank Accession X56240), wobei ein Teil der  
      nichtcodierenden Region des USP-Gens im Promotor enthalten  
      ist. Das 684 Basenpaar große Promotorfragment wurde mittels  
      käuflichen T7-Standardprimer (Stratagene) und mit Hilfe eines  
      synthetisierten Primers über eine PCR-Reaktion nach Standard-  
35      methoden amplifiziert (Primersequenz: 5'-GTCGACCCGCGGACTAGTG-  
      GGCCCTCTAGACCCGGGGATCC GGATCTGCTGGCTATGAA-3'). Das PCR-  
      Fragment wurde mit EcoRI/SalI nachgeschnitten und in den  
      Vektor pBin19 mit OCS Terminator eingesetzt. Es entstand  
      das Plasmid mit der Bezeichnung pBinUSP.

- 40 d) Konstruktion eines Expressionskonstruktes unter Kontrolle  
      des vATPase-C1-Promotors aus Beta vulgaris:

- Analog zum Expressionsplasmid mit dem USP-Promotor wurde  
ein Konstrukt unter Verwendung des v-ATPase-cl-Promotors  
45      erstellt. Der Promotor wurde als EcoRI/KpnI Fragment in das  
      Plasmid pBin19 mit OCS Terminator kloniert und über BamHI  
      das  $\Delta 6$ -Desaturasegen aus *P. patens* zwischen Promotor und



## 32

Terminator inseriert. Der Promotor entspricht einem 1153 Basenpaarfragment aus beta-Vulgaris (Plant Mol Biol, 1999, 39:463-475).

- 5 Das Konstrukt wurde zur Transformation von Arabidopsis thaliana und Rapspflanzen eingesetzt.

Beispiel 8: Erzeugung transgener Rapspflanzen (verändert nach Moloney et al., 1992, Plant Cell Reports, 8:238-242)

10

- Zur Erzeugung transgener Rapspflanzen wurden binäre Vektoren in Agrobacterium tumefaciens C58C1:pGV2260 oder Escherichia coli genutzt (Deblaere et al, 1984, Nucl. Acids. Res. 13, 4777-4788). Zur Transformation von Rapspflanzen (Var. Drakkar, NPZ Nord-deutsche Pflanzenzucht, Hohenlieth, Deutschland), wurde eine 1:50 Verdünnung einer Übernachtskultur einer positiv transformierten Agrobakterienkolonie in Murashige-Skoog Medium (Murashige und Skoog 1962 Physiol. Plant. 15, 473) mit 3 % Saccharose (3MS-Medium) benutzt. Petiolen oder Hypokotyledonen frisch gekeimter steriler Rapspflanzen (zu je ca. 1 cm<sup>2</sup>) wurden in einer Petrischale mit einer 1:50 Agrobakterienverdünnung für 5-10 Minuten inkubiert. Es folgte eine 3-tägige Inkubation in Dunkelheit bei 25°C auf 3MS-Medium mit 0,8 % Bacto-Agar. Die Kultivierung wurde nach 3 Tagen mit 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit weitergeführt und in wöchentlichem Rhythmus auf MS-Medium mit 500 mg/l Claforan (Cefotaxime-Natrium), 50 mg/l Kanamycin, 20 µM Benzylaminopurin (BAP) und 1,6 g/l Glukose weitergeführt. Wachsende Sprosse wurden auf MS-Medium mit 2 % Saccharose, 250 mg/l Claforan und 0,8 % Bacto-Agar überführt. Bildeten sich nach drei Wochen keine Wurzeln, so wurde als Wachstumshormon 2-Indolbuttersäure zum Bewurzeln zum Medium zugegeben.

- Regenerierte Sprosse wurden auf 2MS-Medium mit Kanamycin und Claforan erhalten, nach Bewurzelung in Erde überführt und nach Kultivierung für zwei Wochen in einer Klimakammer oder im Gewächshaus angezogen, zur Blüte gebracht, reife Samen geerntet und auf Δ6-Desaturase-Expression mittels Lipidanalysen untersucht. Linien mit erhöhten Gehalten an oder Doppelbindungen an der Δ6-Position wurden identifiziert. Es konnte in den stabil transformierten transgenen Linien, die das Transgen funktionell exprimierten, ein erhöhter Gehalt von Doppelbindungen an der Δ6-Position im Vergleich zu untransformierten Kontrollpflanzen festgestellt werden.

45

## Beispiel 8: Lipidextraktion aus Samen

Das Pflanzenmaterial wurde zunächst mechanisch durch Mörsern homogenisiert, um es einer Extraktion zugänglicher zu machen.

5

Dann wurde es 10 min bei 100°C abgekocht und nach dem Abkühlen auf Eis sedimentiert. Das Zellsediment wurde mit 1 N methanolischer Schwefelsäure und 2 % Dimethoxypropan 1h bei 90°C hydrolysiert und die Lipide transmethyliert. Die resultierenden Fettsäure-  
10 methylester (FAME) wurden in Petrolether extrahiert. Die extrahierten FAME wurden durch Gasflüssigkeitschromatographie mit einer Kapillarsäule (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 m, 0,32 mm) und einem Temperaturgradienten von 170°C auf 240°C in 20 min und 5 min bei 240°C analysiert. Die Identität der Fett-  
15 säuremethylester wurde durch Vergleich mit entsprechenden FAME-Standards (Sigma) bestätigt. Die Identität und die Position der Doppelbindung konnte durch geeignete chemische Derivatisierung der FAME-Gemische z.B. zu 4,4-Dimethoxyoxazolin-Derivaten (Christie, 1997, in: Advances in Lipid Methodology, 4. Auflage:  
20 Christie, Oily Press, Dundee, 119-169, und 1998, Gaschromatographie-Massenspektrometrie Verfahren, Lipide 33:343-353) mittels GC-MS weiter analysiert werden. Die GC-Analysen der Fettsäuremethylester aus den transgenen Rapssamen, die samenspezifisch die  $\Delta 6$ -Desaturase exprimierten sind in Tabelle III dargestellt. Die  
25 transgenen Rapssamen weisen mindestens 4,95 %  $\gamma$ -Linolensäure im Samen auf.

Tabelle III gibt die GC-Analysen der Fettsäuremethylester aus reifen, transgenen Rapssamen, die  $\Delta 6$ -Desaturase samen-  
30 spezifisch exprimieren, wieder. Die Fettsäurezusammensetzung ist in [mol %] der Gesamtfettsäuren angegeben. Es ist festzustellen, daß einzelne Pflanzen der T2 Generation, die aus positiv transformierten und geselbsteten Pflanzen erhalten wurden, bis zu ca. 4,95 %  $\gamma$ -Linolensäure enthalten.

35

40

45

Tabelle III: GC-Analysen der Fettsäuremethylester von Raps

	Bezeichnung	18:0	18:1	18:2	18:3 (γ)	18:3 (α)	18:4
5	R2-T2-11/1a	1,98	53,58	22,63	3,86	11,38	0
	R2-T2-11/1b	1,86	52,04	25,45	2,31	11,39	0
	R2-T2-11/1c	1,95	49,17	24,30	2,84	9,20	0
	R2-T2-11/3	1,82	49,83	24,54	3,88	10,12	0
	R2-T2-11/4	1,72	48,02	24,66	4,95	9,52	0
10	R2-T2-11/5a	1,73	51,98	25,27	4,27	9,61	0
	R2-T2-11/5b	2,02	56,19	25,08	0	9,33	0
	R2-T2-11/5c	2,01	46,95	27,38	0	10,37	0
	R2-T2-11/5d	1,83	49,49	24,15	4,40	8,65	0
	R2-T2-11/6	2,08	54,52	23,94	2,05	9,29	0
	R2-T2-11/10	1,94	53,92	22,81	4,06	9,44	0
15	R2-T2-WT	1,90	47,75	30,91	0	10,51	0

20

25

30

35

40

45

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren, da-  
5 durch gekennzeichnet, daß mindestens eine isolierte Nuklein-  
säuresequenz, die für ein Polypeptid mit  $\Delta 6$ -Desaturase-  
aktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe:
- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dar-  
10 gestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des  
degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1  
15 ableiten
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäure-  
sequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2 dar-  
gestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens  
20 50 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß  
die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich  
reduziert ist,
- in einen Organismus eingebracht wird, dieser Organismus  
angezogen wird, wobei der angezogene Organismus mindestens  
25 1 Mol-% ungesättigte Fettsäuren bezogen auf den gesamten  
Fettsäuregehalt im Organismus enthält.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die  
Nukleinsäuresequenz von einer Pflanze oder Alge stammt.
- 30 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet,  
daß die Nukleinsäuresequenz von *Physcomitrella patens* stammt.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekenn-  
35 zeichnet, daß es sich bei dem Organismus um ein organismus  
ausgewählt aus der Gruppe Bakterium, Pilz, Ciliat, Alge,  
Cyanobakterium, Tier oder Pflanze handelt.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekenn-  
40 zeichnet, daß es sich bei dem Organismus um eine Pflanze  
oder Alge handelt.

## 36

6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Organismus um eine Ölfruchtpflanzen handelt.
- 5 7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der angezogene Organismus mindestens 5 Gew-% ungesättigte Fettsäuren bezogen auf den gesamten Fettsäuregehalt im Organismus enthält.
- 10 8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die ungesättigten Fettsäuren aus dem Organismus isoliert werden.
9. Transgener Organismus ausgewählt aus der Gruppe Pflanzen,  
15 Pilze, Ciliaten, Algen, Bakterien, Cyanobakterien oder Tiere, die mindestens eine isolierte Nukleinsäuresequenz enthalten, die für ein Polypeptid mit  $\Delta 6$ -Desaturaseaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe:
- 20 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des  
degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1  
25 ableiten
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens  
30 50 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist.
10. Transgener Organismus nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Organismus um eine Pflanze  
35 oder Alge handelt.
11. Öl, Lipide oder Fettsäuren oder eine Fraktion davon, hergestellt durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1  
40 bis 8.
12. Verwendung der Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung nach Anspruch 11 oder transgene Organismen nach Anspruch 9 in Futtermitteln, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika.  
45

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;170&gt; PatentIn Vers. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 2012

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Physcomitrella patens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (319)..(1896)

&lt;400&gt; 1

```

ccgagtcgcg gatcagccat cgcccgccca gggccgcctg cattgtgtgg gacggtgttg 60

gaggaggagg cagatgcgcg ggcgttggtg gagtcgtcat ccgaggatct actgcccga 120

tacctccggg ttttgagcgc ggcaaactct gttgcggctc ggaaggctat aggttcggca 180

ggagactgtt gattttatgt cgggggcatt gccattgtgg agagcggggg agactcagga 240

tctgtgagtg tgcgtgcagc gccccgactg ccgcagagcg tctgtgtatg acgaggttgt 300

tgtggagcgc cttttgaa atg gta ttc gcg ggc ggt gga ctt cag cag ggc 351
          Met Val Phe Ala Gly Gly Gly Leu Gln Gln Gly
              1              5              10

tct ctc gaa gaa aac atc gac gtc gag cac att gcc agt atg tct ctc 399
Ser Leu Glu Glu Asn Ile Asp Val Glu His Ile Ala Ser Met Ser Leu
          15              20              25

ttc agc gac ttc ttc agt tat gtg tct tca act gtt ggt tcg tgg agc 447
Phe Ser Asp Phe Phe Ser Tyr Val Ser Ser Thr Val Gly Ser Trp Ser
          30              35              40

gta cac agt ata caa cct ttg aag cgc ctg acg agt aag aag cgt gtt 495
Val His Ser Ile Gln Pro Leu Lys Arg Leu Thr Ser Lys Lys Arg Val
          45              50              55

tcg gaa agc gct gcc gtg caa tgt ata tca gct gaa gtt cag aga aat 543
Ser Glu Ser Ala Ala Val Gln Cys Ile Ser Ala Glu Val Gln Arg Asn
          60              65              70              75

tcg agt acc cag gga act gcg gag gca ctc gca gaa tca gtc gtg aag 591
Ser Ser Thr Gln Gly Thr Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ser Val Val Lys
          80              85              90

ccc acg aga cga agg tca tct cag tgg aag aag tcg aca cac ccc cta 639
Pro Thr Arg Arg Arg Ser Ser Gln Trp Lys Lys Ser Thr His Pro Leu
          95              100              105

```

tca gaa gta gca gta cac aac aag cca agc gat tgc tgg att gtt gta	687
Ser Glu Val Ala Val His Asn Lys Pro Ser Asp Cys Trp Ile Val Val	
110 115 120	
aaa aac aag gtg tat gat gtt tcc aat ttt gcg gac gag cat ccc gga	735
Lys Asn Lys Val Tyr Asp Val Ser Asn Phe Ala Asp Glu His Pro Gly	
125 130 135	
gga tca gtt att agt act tat ttt gga cga gac ggc aca gat gtt ttc	783
Gly Ser Val Ile Ser Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr Asp Val Phe	
140 145 150 155	
tct agt ttt cat gca gct tct aca tgg aaa att ctt caa gac ttt tac	831
Ser Ser Phe His Ala Ala Ser Thr Trp Lys Ile Leu Gln Asp Phe Tyr	
160 165 170	
att ggt gac gtg gag agg gtg gag ccg act cca gag ctg ctg aaa gat	879
Ile Gly Asp Val Glu Arg Val Glu Pro Thr Pro Glu Leu Leu Lys Asp	
175 180 185	
ttc cga gaa atg aga gct ctt ttc ctg agg gag caa ctt ttc aaa agt	927
Phe Arg Glu Met Arg Ala Leu Phe Leu Arg Glu Gln Leu Phe Lys Ser	
190 195 200	
tcg aaa ttg tac tat gtt atg aag ctg ctc acg aat gtt gct att ttt	975
Ser Lys Leu Tyr Tyr Val Met Lys Leu Leu Thr Asn Val Ala Ile Phe	
205 210 215	
gct gcg agc att gca ata ata tgt tgg agc aag act att tca gcg gtt	1023
Ala Ala Ser Ile Ala Ile Ile Cys Trp Ser Lys Thr Ile Ser Ala Val	
220 225 230 235	
ttg gct tca gct tgt atg atg gct ctg tgt ttc caa cag tgc gga tgg	1071
Leu Ala Ser Ala Cys Met Met Ala Leu Cys Phe Gln Gln Cys Gly Trp	
240 245 250	
cta tcc cat gat ttt ctc cac aat cag gtg ttt gag aca cgc tgg ctt	1119
Leu Ser His Asp Phe Leu His Asn Gln Val Phe Glu Thr Arg Trp Leu	
255 260 265	
aat gaa gtt gtc ggg tat gtg atc ggc aac gcc gtt ctg ggg ttt agt	1167
Asn Glu Val Val Gly Tyr Val Ile Gly Asn Ala Val Leu Gly Phe Ser	
270 275 280	
aca ggg tgg tgg aag gag aag cat aac ctt cat cat gct gct cca aat	1215
Thr Gly Trp Trp Lys Glu Lys His Asn Leu His His Ala Ala Pro Asn	
285 290 295	
gaa tgc gat cag act tac caa cca att gat gaa gat att gat act ctc	1263
Glu Cys Asp Gln Thr Tyr Gln Pro Ile Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu	

300	305	310	315	
ccc ctc att gcc tgg agc aag gac ata ctg gcc aca gtt gag aat aag				1311
Pro Leu Ile Ala Trp Ser Lys Asp Ile Leu Ala Thr Val Glu Asn Lys				
	320	325	330	
aca ttc ttg cga atc ctc caa tac cag cat ctg ttc ttc atg ggt ctg				1359
Thr Phe Leu Arg Ile Leu Gln Tyr Gln His Leu Phe Phe Met Gly Leu				
	335	340	345	
tta ttt ttc gcc cgt ggt agt tgg ctc ttt tgg agc tgg aga tat acc				1407
Leu Phe Phe Ala Arg Gly Ser Trp Leu Phe Trp Ser Trp Arg Tyr Thr				
	350	355	360	
tct aca gca gtg ctc tca cct gtc gac agg ttg ttg gag aag gga act				1455
Ser Thr Ala Val Leu Ser Pro Val Asp Arg Leu Leu Glu Lys Gly Thr				
	365	370	375	
gtt ctg ttt cac tac ttt tgg ttc gtc ggg aca gcg tgc tat ctt ctc				1503
Val Leu Phe His Tyr Phe Trp Phe Val Gly Thr Ala Cys Tyr Leu Leu				
	380	385	390	395
cct ggt tgg aag cca tta gta tgg atg gcg gtg act gag ctc atg tcc				1551
Pro Gly Trp Lys Pro Leu Val Trp Met Ala Val Thr Glu Leu Met Ser				
	400	405	410	
ggc atg ctg ctg ggc ttt gta ttt gta ctt agc cac aat ggg atg gag				1599
Gly Met Leu Leu Gly Phe Val Phe Val Leu Ser His Asn Gly Met Glu				
	415	420	425	
gtt tat aat tcg tct aaa gaa ttc gtg agt gca cag atc gta tcc aca				1647
Val Tyr Asn Ser Ser Lys Glu Phe Val Ser Ala Gln Ile Val Ser Thr				
	430	435	440	
cgg gat atc aaa gga aac ata ttc aac gac tgg ttc act ggt ggc ctt				1695
Arg Asp Ile Lys Gly Asn Ile Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu				
	445	450	455	
aac agg caa ata gag cat cat ctt ttc cca aca atg ccc agg cat aat				1743
Asn Arg Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn				
	460	465	470	475
tta aac aaa ata gca cct aga gtg gag gtg ttc tgt aag aaa cac ggt				1791
Leu Asn Lys Ile Ala Pro Arg Val Glu Val Phe Cys Lys Lys His Gly				
	480	485	490	
ctg gtg tac gaa gac gta tct att gct acc ggc act tgc aag gtt ttg				1839
Leu Val Tyr Glu Asp Val Ser Ile Ala Thr Gly Thr Cys Lys Val Leu				
	495	500	505	
aaa gca ttg aag gaa gtc gcg gag gct gcg gca gag cag cat gct acc				1887



4

Lys Ala Leu Lys Glu Val Ala Glu Ala Ala Glu Gln His Ala Thr  
 510 515 520

acc agt taa cagtctttgg aaagcttggc aattgatctt tattctccac 1936  
 Thr Ser  
 525

ggcagttgct tgtttggtttt ggggtgaatg accgaatgta ctggcatcca ttcttctgta 1996

gccatcaatt ttgaac 2012

<210> 2

<211> 525

<212> PRT

<213> *Physcomitrella patens*

<400> 2

Met Val Phe Ala Gly Gly Gly Leu Gln Gln Gly Ser Leu Glu Glu Asn  
 1 5 10 15

Ile Asp Val Glu His Ile Ala Ser Met Ser Leu Phe Ser Asp Phe Phe  
 20 25 30

Ser Tyr Val Ser Ser Thr Val Gly Ser Trp Ser Val His Ser Ile Gln  
 35 40 45

Pro Leu Lys Arg Leu Thr Ser Lys Lys Arg Val Ser Glu Ser Ala Ala  
 50 55 60

Val Gln Cys Ile Ser Ala Glu Val Gln Arg Asn Ser Ser Thr Gln Gly  
 65 70 75 80

Thr Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ser Val Val Lys Pro Thr Arg Arg Arg  
 85 90 95

Ser Ser Gln Trp Lys Lys Ser Thr His Pro Leu Ser Glu Val Ala Val  
 100 105 110

His Asn Lys Pro Ser Asp Cys Trp Ile Val Val Lys Asn Lys Val Tyr  
 115 120 125

Asp Val Ser Asn Phe Ala Asp Glu His Pro Gly Gly Ser Val Ile Ser  
 130 135 140

Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr Asp Val Phe Ser Ser Phe His Ala  
 145 150 155 160

Ala Ser Thr Trp Lys Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Ile Gly Asp Val Glu  
 165 170 175

## 5

Arg Val Glu Pro Thr Pro Glu Leu Leu Lys Asp Phe Arg Glu Met Arg  
 180 185 190

Ala Leu Phe Leu Arg Glu Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Leu Tyr Tyr  
 195 200 205

Val Met Lys Leu Leu Thr Asn Val Ala Ile Phe Ala Ala Ser Ile Ala  
 210 215 220

Ile Ile Cys Trp Ser Lys Thr Ile Ser Ala Val Leu Ala Ser Ala Cys  
 225 230 235 240

Met Met Ala Leu Cys Phe Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe  
 245 250 255

Leu His Asn Gln Val Phe Glu Thr Arg Trp Leu Asn Glu Val Val Gly  
 260 265 270

Tyr Val Ile Gly Asn Ala Val Leu Gly Phe Ser Thr Gly Trp Trp Lys  
 275 280 285

Glu Lys His Asn Leu His His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Thr  
 290 295 300

Tyr Gln Pro Ile Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Leu Ile Ala Trp  
 305 310 315 320

Ser Lys Asp Ile Leu Ala Thr Val Glu Asn Lys Thr Phe Leu Arg Ile  
 325 330 335

Leu Gln Tyr Gln His Leu Phe Phe Met Gly Leu Leu Phe Phe Ala Arg  
 340 345 350

Gly Ser Trp Leu Phe Trp Ser Trp Arg Tyr Thr Ser Thr Ala Val Leu  
 355 360 365

Ser Pro Val Asp Arg Leu Leu Glu Lys Gly Thr Val Leu Phe His Tyr  
 370 375 380

Phe Trp Phe Val Gly Thr Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro  
 385 390 395 400

Leu Val Trp Met Ala Val Thr Glu Leu Met Ser Gly Met Leu Leu Gly  
 405 410 415

Phe Val Phe Val Leu Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Ser Ser  
 420 425 430

Lys Glu Phe Val Ser Ala Gln Ile Val Ser Thr Arg Asp Ile Lys Gly  
 435 440 445

## 6

Asn Ile Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu  
450 455 460

His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ala  
465 470 475 480

Pro Arg Val Glu Val Phe Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp  
485 490 495

Val Ser Ile Ala Thr Gly Thr Cys Lys Val Leu Lys Ala Leu Lys Glu  
500 505 510

Val Ala Glu Ala Ala Ala Glu Gln His Ala Thr Thr Ser  
515 520 525

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/06223

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/82 C12N9/02 C12N15/53 C12P7/64 C11C3/00  
A01H5/00 A01H13/00 A01H15/00 A23L1/30 A23K1/16  
A61K35/78

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, SCISEARCH, STRAND

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	SPERLING, P. ET AL.: "A bifunctional delta-6-fatty acyl acetylenase/desaturase from the moss <i>Ceratodon purpureus</i> " EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 267, June 2000 (2000-06), pages 3801-3811, XP000941309 the whole document	1-4,7-11
X	GIRKE, T. ET AL.: "Identification of a novel delta-6-acyl-group desaturase by targeted gene disruption in <i>Physcomitrella patens</i> " THE PLANT JOURNAL, vol. 15, no. 1, July 1998 (1998-07), pages 39-48, XP000881712 cited in the application	1-4,7-11
Y	the whole document	5,6

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 November 2000

Date of mailing of the international search report

24/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Donath, C

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. .onal Application No  
PCT/EP 00/06223

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 46764 A (CALGENE LLC) 22 November 1998 (1998-11-22) cited in the application	11,12
Y	page 5, line 27 -page 6, line 17 page 8, line 19 -page 36, line 27; examples 6-8,13,14,16 ---	1-10
X	WO 99 27111 A (UNIVERSITY OF BRISTOL) 3 June 1999 (1999-06-03) cited in the application	11
Y	page 4, line 7 -page 9, line 28; examples 1,2 ---	1-10
X	SAYANOVA, O. ET AL.: "Expression of a borage desaturase cDNA containing an N-terminal cytochrome b5 domain results in the accumulation of high levels of delta-6-desaturated fatty acids in transgenic tobacco" PROC.NATL.ACAD.SCI.USA, vol. 94, April 1997 (1997-04), pages 4211-4216, XP002099447 cited in the application	11
Y	the whole document ---	1-10
X	WO 96 21022 A (RHONE-POULENC AGROCHIMIE) 11 July 1996 (1996-07-11) cited in the application	11
Y	page 3, line 3 - line 23 page 5, line 16 -page 19, line 24; examples 6,13,14 -----	1-10

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/06223

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9846764 A	22-10-1998	US 5972664 A	26-10-1999
		US 6075183 A	13-06-2000
		US 5968809 A	19-10-1999
		US 6051754 A	18-04-2000
		AU 720677 B	08-06-2000
		AU 7114798 A	11-11-1998
		AU 720725 B	08-06-2000
		AU 7114898 A	11-11-1998
		BG 103796 A	31-05-2000
		BG 103798 A	31-05-2000
		BR 9808506 A	23-05-2000
		BR 9809083 A	01-08-2000
		CN 1253587 T	17-05-2000
		CN 1253588 T	17-05-2000
		EP 0996732 A	03-05-2000
		EP 1007691 A	14-06-2000
		NO 994924 A	30-11-1999
		NO 994926 A	30-11-1999
		PL 336067 A	05-06-2000
		PL 336077 A	05-06-2000
		WO 9846765 A	22-10-1998
		AU 6961698 A	11-11-1998
		BG 103797 A	28-04-2000
		BR 9808507 A	23-05-2000
		CN 1252099 T	03-05-2000
		EP 0975766 A	02-02-2000
		NO 994925 A	30-11-1999
		PL 336143 A	05-06-2000
		WO 9846763 A	22-10-1998
WO 9927111 A	03-06-1999	AU 1249799 A	15-06-1999
		EP 1032682 A	06-09-2000
		ZA 9810716 A	16-06-1999
WO 9621022 A	11-07-1996	US 5614393 A	25-03-1997
		AU 707061 B	01-07-1999
		AU 4673596 A	24-07-1996
		BR 9510411 A	19-05-1998
		CA 2207906 A	11-07-1996
		CN 1177379 A	25-03-1998
		EP 0801680 A	22-10-1997
		JP 10511848 T	17-11-1998
		US 5789220 A	04-08-1998

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/06223

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/82 C12N9/02 C12N15/53 C12P7/64 C11C3/00  
A01H5/00 A01H13/00 A01H15/00 A23L1/30 A23K1/16  
A61K35/78

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, SCISEARCH, STRAND

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	SPERLING, P. ET AL.: "A bifunctional delta-6-fatty acyl acetylenase/desaturase from the moss <i>Ceratodon purpureus</i> " EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 267, Juni 2000 (2000-06), Seiten 3801-3811, XP000941309 das ganze Dokument	1-4,7-11
X	GIRKE, T. ET AL.: "Identification of a novel delta-6-acyl-group desaturase by targeted gene disruption in <i>Physcomitrella patens</i> " THE PLANT JOURNAL, Bd. 15, Nr. 1, Juli 1998 (1998-07), Seiten 39-48, XP000881712 in der Anmeldung erwähnt	1-4,7-11
Y	das ganze Dokument	5,6



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

9. November 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

24/11/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Donath, C

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/06223

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 46764 A (CALGENE LLC) 22. November 1998 (1998-11-22) in der Anmeldung erwähnt	11,12
Y	Seite 5, Zeile 27 -Seite 6, Zeile 17 Seite 8, Zeile 19 -Seite 36, Zeile 27; Beispiele 6-8,13,14,16 ----	1-10
X	WO 99 27111 A (UNIVERSITY OF BRISTOL) 3. Juni 1999 (1999-06-03) in der Anmeldung erwähnt	11
Y	Seite 4, Zeile 7 -Seite 9, Zeile 28; Beispiele 1,2 ----	1-10
X	SAYANOVA, O. ET AL.: "Expression of a borage desaturase cDNA containing an N-terminal cytochrome b5 domain results in the accumulation of high levels of delta-6-desaturated fatty acids in transgenic tobacco" PROC.NATL.ACAD.SCI.USA, Bd. 94, April 1997 (1997-04), Seiten 4211-4216, XP002099447 in der Anmeldung erwähnt	11
Y	das ganze Dokument ----	1-10
X	WO 96 21022 A (RHONE-POULENC AGROCHIMIE) 11. Juli 1996 (1996-07-11) in der Anmeldung erwähnt	11
Y	Seite 3, Zeile 3 - Zeile 23 Seite 5, Zeile 16 -Seite 19, Zeile 24; Beispiele 6,13,14 -----	1-10



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/06223

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9846764 A	22-10-1998	US 5972664 A	26-10-1999
		US 6075183 A	13-06-2000
		US 5968809 A	19-10-1999
		US 6051754 A	18-04-2000
		AU 720677 B	08-06-2000
		AU 7114798 A	11-11-1998
		AU 720725 B	08-06-2000
		AU 7114898 A	11-11-1998
		BG 103796 A	31-05-2000
		BG 103798 A	31-05-2000
		BR 9808506 A	23-05-2000
		BR 9809083 A	01-08-2000
		CN 1253587 T	17-05-2000
		CN 1253588 T	17-05-2000
		EP 0996732 A	03-05-2000
		EP 1007691 A	14-06-2000
		NO 994924 A	30-11-1999
		NO 994926 A	30-11-1999
		PL 336067 A	05-06-2000
		PL 336077 A	05-06-2000
		WO 9846765 A	22-10-1998
		AU 6961698 A	11-11-1998
		BG 103797 A	28-04-2000
		BR 9808507 A	23-05-2000
		CN 1252099 T	03-05-2000
		EP 0975766 A	02-02-2000
		NO 994925 A	30-11-1999
		PL 336143 A	05-06-2000
		WO 9846763 A	22-10-1998
WO 9927111 A	03-06-1999	AU 1249799 A	15-06-1999
		EP 1032682 A	06-09-2000
		ZA 9810716 A	16-06-1999
WO 9621022 A	11-07-1996	US 5614393 A	25-03-1997
		AU 707061 B	01-07-1999
		AU 4673596 A	24-07-1996
		BR 9510411 A	19-05-1998
		CA 2207906 A	11-07-1996
		CN 1177379 A	25-03-1998
		EP 0801680 A	22-10-1997
		JP 10511848 T	17-11-1998
		US 5789220 A	04-08-1998